

**Egy Polycomb Response Element (PRE) *in situ* vizsgálata *Drosophila melanogaster*-ben
génkonverzió segítségével**

Ph.D. értekezés

Készítette: Kozma Gabriella

Témavezető: Dr. Sipos László

MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Szeged, 2008.

"All religions, arts and sciences are branches of the same tree. All these aspirations are directed toward ennobling man's life, lifting it from the sphere of mere physical existence and leading the individual towards freedom."

/Albert Einstein/

"Aki olvas és érdeklődik, az feljebbvaló a tudatlannál;

Aki megőrzi emlékezetében az olvasottakat, az feljebbvaló annál, aki csak olvas és érdeklődik;

Aki megérti az olvasottakat, az feljebbvaló annál, aki csak megőrzi emlékezetében az olvasottakat;

Aki életbelepteti az olvasottakat, az feljebbvaló annál, aki csak megérti az olvasottakat;

Aki eredményeket ér el, az feljebbvaló annál, aki csak életbelepteti az olvasottakat;

Aki természetfeletti erőket szerez meg, az feljebbvaló annál, aki csak eredményeket ér el;

Aki beilleszkedik az önmagától létezőbe, elnyerve a bölcsességet (és így számára minden lehetségessé válik), az feljebbvaló annál, aki csak természetfeletti erőket szerez meg"

/részlet a Tantra Szárából/

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	1. oldal
Bevezető	3. oldal
Általános irodalmi bevezető és célkitűzések	3. oldal
A PcG fehérjék és komplexek	14. oldal
A TrxG komplexek legfontosabb tulajdonságai	15. oldal
Van-e a PRE/TRE-knak konszenzus szekvenciája?	16. oldal
Mit tudunk a PRE/TRE-k működéséről?	19. oldal
Célkitűzések	27. oldal
Anyagok és módszerek	29. oldal
<i>Drosophila</i> tenyésztési körülmények és keresztezések	28. oldal
PCR és DNS-preparálás	29. oldal
A DNS-fragmentumok forrásai	29. oldal
A génkonverziós kísérletek leírása	32. oldal
Deléció létrehozása a konverziós kromoszómán FLP rekombinááz segítségével	33. oldal
Deléció/duplikáció létrehozása két konverziós kromoszó- ma közötti rekombinációval FLP rekombinááz segítségével ...	33. oldal
Deléció létrehozása a konverziós/deléciós kromoszómán I-SceI endonukleáz segítségével	34. oldal
A legyek fenotípusának kiértékelése	34. oldal
Immunfestés embriókon és lárvákon	34. oldal
A lárvális kutikula előkészítése és fényképezése	35. oldal
Homológia keresés BLAST-tal	35. oldal

Eredmények	37. oldal
A P-elem közvetítette génkonverzió módszerének továbbfejlesztése	37. oldal
Az első deléciók létrehozása a központi PRE-régióban	43. oldal
Funkciónyeréses fenotípust okozó kisebb deléciók a központi PRE-régióban	47. oldal
A környező szakaszok vizsgálata	50. oldal
PRE-duplikációk	51. oldal
A PRE-mag helyettesítése más szekvenciákkal	52. oldal
A PRE-magban található fehérje-kötőhelyek elrontása	59. oldal
A lokális kromatinszerkezet vizsgálata a <i>bxd</i> PRE-ban	61. oldal
Az eredmények megvitatása	67. oldal
A P-elem közvetítette génkonverzióban rejlő lehetőségek és a PRE-k <i>in situ</i> vizsgálata	67. oldal
A <i>bxd</i> PRE moduláris szerkezete	68. oldal
A PRE-k együttműködése	69. oldal
A TRE-k és PRE-k szerepe eredeti kromoszomális környezetükben	70. oldal
Útban a PRE-k finomszerkezetének megértése felé	71. oldal
Függelék	76. oldal
A bithorax komplex (BX-C) működése	76. oldal
Irodalomjegyzék	83. oldal
Közlemények jegyzéke	96. oldal
Köszönetnyilvánítás	97. oldal
Összefoglalás	98. oldal
Summary	103. oldal

BEVEZETŐ

Általános irodalmi bevezető és célkitűzések

Az egyedfejlődés egyik legizgalmasabb kérdése, hogy vajon hogyan zajlik a szervezetet alkotó sejtek specializációja. A specializáció hátterében a mintázatképződés során kialakuló specifikus génexpressziós mintázatok állnak. Ez azt jelenti, hogy egy adott sejtsors irányába elköteleződött sejtben csak azok a gének fejeződnek ki, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ez a sejtípus el tudja látni a „rábízott feladatokat”. A „használaton kívüli” gének kikapcsolódnak, inaktív állapotba kerülnek benne. A megfelelő génexpressziós mintázatot a sejt „memóriája” segítségével élete végéig fenntartja, osztódáskor pedig továbbadja az utódsejtnek. Ez a specializált állapot megőrzésének feltétele. *Drosophila*-ban az imágókorongokat alkotó sejtszoptok már az embriogenezis során elköteleződnek egy bizonyos sejtsors irányába, de csak báb állapotban, a metamorfózis során valósul meg a korábban meghatározott sejtprogram: az imágókorong-sejtekből kifejlődnek a felnőtt állat külső struktúrái. Az imágókorongok sejtjei még idegen környezetben (pl. a felnőtt nőstény légy hemolimfájában) történő hosszabb inkubáció után, és a normálisnál több sejtszoptódáson keresztülmenve is azokat a függelékeket és struktúrákat alakítják ki, amelyek létrehozására eredetileg programozódtak, vagyis emlékeznek a kezdeti determinált állapotukra (Hadorn, 1978).

Vajon mi az a molekuláris mechanizmus, amely fenntartja a különböző differenciált állapotokat? Hogyan őrződik meg egy adott sejtípusra jellemző génexpressziós mintázat a DNS-replikáció és a mitózis során? A *Drosophila melanogaster* ideális modellszervezet a fejlődésbiológia ezen alapvető kérdéseinek tanulmányozására, hiszen számos olyan génjét jellemezték már, amely szerepet játszik a különböző sejtsorsok meghatározásában. *Drosophila*-ban fedezték fel például a homeotikus (*Hox*) géneket, amelyek homológjai az egész állatvilágban olyan transzkripciós faktorokat kódolnak, melyek az anterior-poszterior tengely mentén kialakuló testrészeket határozzák meg. Jól ismert, hogy a homeotikus gének mutációi egy vagy néhány szelvényt érintő látványos szelvénytranszformációkat okoznak. Hasonló fenotípusokat figyeltek meg ugyanakkor a mutációk egy más, nem *Hox* géneket érintő csoportja esetében, amelyről kiderült, hogy a hiba a homeotikus géneket szabályozó génekben van. Részletes genetikai és molekuláris vizsgálatok bizonyították, hogy ezek a mutációk az egymással ellentétes funkciójú *Polycomb* (*Polycomb Group*, *PcG*) és *trithorax* csoport (*trithorax Group*, *trxG*)

génjeiben következtek be, melyek szükségesek bizonyos egyedfejlődésben fontos szabályozó faktorok – mint például a *Hox* gének – génkifejeződési mintázatának fenntartásához (Simon, 1995). A *PcG* mutációk fenotípusainak hátterében például az Antennapedia (ANT-C) és bithorax komplexekben (BX-C, lsd. FÜGGELÉK) található homeotikus gének derepressziója áll (összefoglalva Kennison, 2004). Ezek a felfedezések magyarázatot adtak arra, hogy a *PcG* és *trxG* mutációk által okozott szelvénytranszformációk – a *Hox* mutációkkal ellentétben – miért érintenek minden testszelvényt. A *PcG* és *trxG* génekről tehát a fenti adatok és megfontolások alapján joggal feltételezhetjük, hogy a sejtmemória alapját képezik.

A *PcG* és *trxG* gének sejtmemóriában betöltött fontos szerepére mutatnak rá azon későbbi eredmények is, melyek szerint a róluk keletkező fehérjék hatalmas fehérjekomplexeket alkotva kapcsolódnak a kromatinhoz, vagyis a géneket hordozó DNS-ből, különböző fehérjékből és RNS-ből álló sejtmagi struktúrákhoz. A kromatin fő fehérje alkotóegységei a hisztonok, amelyekre feltekeredik a teljes hosszát tekintve száz centiméteres nagyságrendbe eső DNS. A tömörített szerkezet ellenére szabadon hozzáférhetőek a hisztonok N-terminális végei, amelyek molekuláris adóvevőként kódolják a hozzájuk tartozó gének transzkripció állapotát. A kódot az N-terminális hisztonfarkak kovalens módosításai – acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubiquitináció – alkotják. A kód megváltozása együtt jár a lokális kromatinszerkezet változásával, amely alapvetően meghatározza, hogy egy gén milyen mértékben „írható át”. A kromatinszerkezet módosításra egy másik lehetőség a hisztonok elmozdítása a DNS-fonal mentén (nukleoszóma remodelling). Számos *PcG* és *TrxG* fehérje rendelkezik az említett kromatinszerkezet-módosító képességek valamelyikével (1. táblázat), ezek segítségével tartják célgénjeiket transzkripcionálisan inaktív (*PcG*), illetve aktív (*TrxG*) állapotban. Az inaktív (zárt) kromatin-konformáció együtt jár a kromatin erős tömörítettségével, míg az aktív (nyílt) kromatin-konformációra viszonylag laza szerkezet jellemző. A *PcG/Trx* fehérjék tehát epigenetikus regulátorok, hiszen a DNS-szekvencia megváltoztatása nélkül, öröklődő módon szabályozzák a génműködést.

A *PcG* és *TrxG* fehérjék konzerváltságot mutatnak a különböző fajok között, így homológjaik emlősökben is megtalálhatók (1. táblázat), ahol analóg szereppel bírnak (Akasaka és mtsai., 2001). A *Drosophila* és a gerincesek ezen fehérjéinek összehasonlításakor a legnagyobb homológiát az E(Z), az ESC és a SU(Z)12 fehérjék esetében találták. Ez a három

<i>Drosophila</i> fehérje	Komplex	Fehérjedomének	Biokémiai aktivitás	Egér fehérje- homológok
Polycomb csoport				
PC	PRC1	Kromodomén	Kötődés a trimetil-H3K27-hez	NPCD, M33 (CBX2), CBX4, CBX6, BX7, CBX8
PH	PRC1	SAM	?	PHC1, PHC2, PHC3
PSC	PRC1	RING	Az SCE kofaktora	BMI1, MEL18
SCE (RING)	PRC1	RING	H2AK119-re specifikus E3 ubiquitin-ligáz	RING1A, RING1B
SCM	PRC1?	SAM, MBT, Zn-finger	?	SCMH1, SCML2
E(Z)	PRC2	SET	H3K9- és H3K27-metiláció	EZH2, EZH1
ESC	PRC2	WD40	Az E(Z) kofaktora	EED
ESCL	PRC2	WD40	Az E(Z) kofaktora	EED
SU(Z)12	PRC2	Zn-finger	?	SUZ12
PCL	PRC2	PHD, Tudor	?	PHF19, MTF2 (M96)
PHO	PHORC	Zn-finger	DNS-kötés	YY1, YY2
PHOL	?	Zn-finger	DNS-kötés	YY1, YY2
SFMBT	PHORC	MBT, SAM	Kötődés a mono- és dimetil-H3K9/H4K20-hoz	L3MBTL2, MBTD1
SU(Z)2	?	RING	?	?
SXC	?	?	?	?
ASX	?	PHD	?	ASXL1, ASXL2
MXC	?	LA, RRM	?	Q9CUQ5
E(PC)	?	?	?	EPC1, EPC2
Trithorax csoport				
TRX	TAC1	PHD,SET	H3K4-metiláció	WBP7, MLL1
ASH1	?	SET, PHD, BAH	H3K4/H3K9/H4K20-metiláció	ASH1L
ASH2	?	PHD, SPRY	?	ASH2L
BRM	SWI/SNF	SNF2, HELICc, Bromodomén	ATP-függő nukleoszómatologatás	SMARCA4
MOR	SWI/SNF	SWIRM, SAINT	A BRM kofaktora	SMARCC4, SMARCC2
OSA	SWI/SNF?	BRIGHT	?	ARID1B

1. táblázat A PcG/TrxG-rendszer főbb komponensei (Schwartz és Pirrotta, 2007). ARID1B, AT-rich interactive domain 1B; ASH, Absent, small, or homeotic discs; ASX, Additional sex combs; BRM, Brahma; CBX, Chromobox homologue; EED, Embryonic ectoderm development; E(PC), Enhancer of *Polycomb*; ESC, Extra sex combs; ESCL, Extra sex combs like; E(Z), Enhancer of *zeste*; MLL1, Myeloid/lymphoid or mixed lineage leukaemia; MOR, Moira; MTF,

Metal response element-binding transcription factor; MXC, Multi sex combs; NPCD, Neuronal pentraxin with chromodomain; PC, Polycomb; PCL, Polycomb-like; PH, Polyhomeotic; PHC, Polyhomeotic-like; PHF19, PHD-finger protein 19; PHO, Pleiohomeotic; PHOL, Pleiohomeotic-like; SCE, Sex combs extra; SCM, Sex comb on midleg; SFMBT, Scm-related gene containing four MBT domains; SU(Z), Suppressor of *zeste*; SXC, Super sex combs; TRX, Trithorax; WBP7, WW-domain binding protein 7; YY, Yin-Yang transcription factor.

fehérje megtalálható *Arabidopsis*-ban (Hsieh és mtsai., 2003) és a SU(Z)12 kivételével *Caenorhabditis elegans*-ban (Pires-daSilva és Sommer, 2003) is, az utóbbiban azonban más, függetlenül kifejlődött PcG fehérjék is fellelhetők. “Menekítési” kísérletekben igazolták, hogy a Polycomb (PC) (Müller és mtsai., 1995) és a Pleiohomeotic (PHO) (Brown és mtsai., 1998; Atchison és mtsai., 2003) PcG fehérjék emlős homológjai, valamint a Trithorax (Muylers-Chen és mtsai., 2004) TrxG fehérje emlős homológja bizonyos mértékben képesek helyettesíteni a légyben található megfelelőjüket.

Meglepő módon a *Drosophila* PcG fehérjéknek – a Pleiohomeotic (PHO) és a Pleiohomeotic-like (PHOL) (Brown és mtsai., 2003) kivételével – nincs DNS-kötő doménje, ami szükséges lenne a szabályozott gén regulátor-régiójához történő kapcsolódáshoz. Azonosítottak azonban számos olyan gént, melyeknek mutációi nem okoznak klasszikus *Polycomb* fenotípust, de az általuk kódolt fehérjék kapcsolatba hozhatók a PcG komplexekkel és rendelkeznek szekvenciaspecifikus DNS-kötő aktivitással is. Ilyen fehérjék például a *Trl* gén által kódolt GAGA faktor (GAF), a Pipsqueak (PSQ) és a Zeste. Ezen fehérjéknek viszont nem találták meg a homológjait gerincesekben. A GAF és a PSQ szekvenciaspecifikitása azonos – és bár különböző doménekkel –, mindkettő a (GA)_n szekvenciát köti (GAF/PSQ-kötőhely).

A *Drosophila* PcG fehérjék kb. 100 különböző helyre kötődnek a lárvális nyálmirigy óriáskromoszómáin (Rastelli és mtsai., 1993; Zink és Paro, 1989). A TRX és az ASH1 TrxG fehérjék kötőhelyei nagyrészt átfednek a PcG fehérje-kötőhelyekkel, valamint ezeken kívül még kb. 80 pozícióban megtalálták őket (Chinwalla és mtsai., 1995; Rozovskaia és mtsai., 1999; Tripoulas és mtsai., 1996). Tehát egyedül ebben a szövetben mintegy 180 lókuszt szabályozódhat PcG és TrxG fehérjék által. A PcG/TrxG-rendszer célgénjei közül a transzkripciós faktorokat kódoló *Hox* génekről rendelkezünk a legtöbb információval, ezért a továbbiakban elsősorban ezekről lesz szó. A *Hox* géneket nagyméretű, összetett szabályozó-régiók (cisz-regulátor, lsd. FÜGGELÉK) vezérlik, ezek teszik lehetővé, hogy célgénjeik szelvény- és szövetspecifikus mintázatban fejeződjenek ki. E mintázat fenntartására szükség van a teljes egyedfejlődés során és

felnőttkorban is. A korai *Drosophila* embrióban a gap és a pair-rule szegmentációs génekről keletkező faktorok grádiensei felelősek a *Hox* gének represszált állapotának kialakításáért a megfelelő testszelvényekben. Később a gap és a pair-rule géntermékek eltűnnek, szerepüket a PcG fehérjék veszik át, mindaddig ismeretlen módon érzékelve a homeotikus gének transzkripcióját szabályozó cisz-regulátor régiók előzőleg beállított aktivitási mintázatát. A *Drosophila* *Hox* gének transzkripciószabályozásához nagytávolságú kölcsönhatásoknak kell kialakulnia az iniciációs hely körül szerveződő alap transzkripciószapparátus és a távoli szabályozóelemekhez kötődő faktorok között. Erre utalnak azok az eredmények is, melyek szerint a PcG fehérjék az általuk szabályozott gének cisz-regulátor régiója mellett azok promóteréhez is kapcsolódnak (Papp és Müller, 2006), így tartják a célgént represszált állapotban. A célgének cisz-regulátor régióiban található, specifikus PcG-kötőhelyeket tartalmazó DNS-szakaszokat PRE-knak (Polycomb Response Element) nevezzük (Pirrotta, 1997; Simon és mtsai., 1993). A TrxG fehérjék specifikus kötőhelye a Trithorax Response Element (TRE), ide kapcsolódva tartják fenn az általuk szabályozott gén aktív transzkripciószállapotát. A TRE-k is a cisz-regulátor régiókban, a PRE-k mellett helyezkednek el. A kétféle szabályozóelemet a legtöbb esetben szekvenciaszinten még nem különítették el, ezért is nevezik őket összefoglalóan PRE/TRE-knak.

Funkcionális tesztekben 5 lókusznál sikerült azonosítani PRE/TRE-kat és az általuk szabályozott géneket. Ezek a következők: a homeotikus géneket tartalmazó BX-C és ANT-C (Gindhart és Kaufman, 1995; Orlando és Paro, 1995; Zink és mtsai., 1991), a *polyhomeotic* lókusznál (Bloyer és mtsai., 2003) (maga is egy PcG gén), valamint az *engrailed* lókusznál (Kassis, 1994) és a *hedgehog* lókusznál (Maurange és Paro, 2002) (szegmentációs gének). Egy genomszintű PRE-prediktáló program (Ringrose és mtsai., 2003) segítségével számos további szegmentációs gén szabályozó régiójában azonosítottak potenciális PRE/TRE-kat. Ezek az eredmények jelzik, hogy az egyedfejlődést irányító, jól jellemzett transzkripciószfaktor-kaszkádok valószínűleg minden szintjére – sőt magukra a *PcG/trxG* génekre is – olyan kromatinszintű szabályozó-mechanismusok is hatnak, amelyeket a PcG/TrxG-rendszer közvetít.

Bizonyították továbbá, hogy a PcG/TrxG fehérjék epigenetikus regulátor funkciója nem korlátozódik a szelvényezett testfelépítés kialakításában résztvevő génekre. Speciális szerepük van a szemfejlődésben (Janody és mtsai., 2004) is, mert mutációjuk az ismert homeotikus célgén (*Ultrabithorax*, *Ubx*) nem megfelelő kifejeződésén kívül más szemfejlődéshez szükséges gének

normális expresszióját is elrontják. Tehát a szemdiszkusban több közvetlen célgénjük is van, ezt megerősítették a PRE-predikciós számítások is. Hasonló eredményeket kaptak egy follikulus-fejlődésben szerepet játszó gének azonosítására tervezett kísérletben (Narbonne és mtsai., 2004): a PcG gének egy bizonyos alcsoportja szükséges a szomatikus ováriumsejtek specifikálásának meghatározásához. Nemrégiben ChIP-pel (chromatin immunoprecipitation, kromatin-immunoprecipitáció) kombinált microarray technikák segítségével genomszinten térképezték a PcG/TrxG-rendszer célgénjeit (Schwartz és mtsai., 2006; Tolhuis és mtsai., 2006). Ezen gének nagy része transzkripciós szabályozófehérjéket, morfogéneket, valamint a fő jelátviteli utak komponenseit kódolja. Úgy tűnik, bármely sejtet vesszük figyelembe, abban a legtöbb genetikai programot „kikapcsolja” a PcG, azok a programok „működnek” csak, amelyekre az adott sejttypusnak szüksége van. Emberi és egér őssejtekben a különböző egyedfejlődési útvonalakat valószínűleg a PcG fehérjék blokkolják, hiszen kötődnek ezen útvonalakat szabályozó kulcsgének regulátor-régióihoz. Differenciációkor az adott sejttypusra jellemző fejlődési útvonalak indukálódnak, ezzel párhuzamosan a megfelelő géneknél csökken a PcG-kötés és a trimetiláció mértéke a H3 hisztonmolekula 27. lizinjén (H3K27met3) (Boyer és mtsai., 2006; Bracken és mtsai., 2006; Lee és mtsai., 2006). Lehetséges, hogy az őssejtekben a pluripotencia együtt jár egy bivalens kromatinállapottal: a pluripotencia-faktorok jelölik ki, mely géneknek van lehetősége differenciációkor aktiválódni vagy véglegesen represszálni. Az őssejtekben a PcG célgénnek ezért hordozzák egyszerre az „inaktíváló” H3K27met3 és az „aktiváló” H3K4met3 jelet (Azuara és mtsai., 2006; Bernstein és mtsai., 2006).

Gerincesekben mindeddig nem sikerült PRE-kat azonosítani, azonban a PcG és TrxG fehérjéknek a *Hox* génekre gyakorolt antagonista hatása esetükben is bizonyított (Hanson és mtsai., 1999). A sejtosztódás és a tumorképződés (Jacobs és van Lohuizen, 2002) folyamataiban is részt vesznek, ilyen funkcióik érdekes módon *Drosophila*-ban nem ismeretesek. Számos bizonyíték utal továbbá arra, hogy a PcG/TrxG-rendszernek – mind a légyben, mind az emberben – van egy fontos, eddigiektől eltérő kromatinszervező szerepe is: részt vállal a telomerek szerkezetének kialakításában (Boivin és mtsai., 2003; Dimri és mtsai., 2002). Tekintve, hogy a két ismert *Drosophila* szekvenciaspecifikus DNS-kötő PcG fehérje (PHO, PHOL) emlős homológja (YY1) egy széles szekvenciaspecifikitással bíró transzkripciós faktor (Hyde-DeRuyscher és mtsai., 1995; Yant és mtsai., 1995), nem ismerjük azokat a kritériumokat, amelyek alapján PRE-kat lehetne találni az emlős genomban. Jelenlegi ismereteink alapján arra

következtethetünk, hogy az emlősök homeotikus komplexeiben található szabályozó-régiók – ezen belül is a PRE-k – szekvencia-összetétele alapvetően különbözik a legyekétől.

A *Hox* gének cisz-regulátorai olyan hatalmas méretűek, hogy működésüket vizsgálni transzgenikus kísérletekben még a *Drosophila*-ban használatos gazdag molekuláris genetikai eszköztárral sem lehetséges. Ezért a *Hox* gének finomszabályozását nagyrészt csak úgy tudták tanulmányozni, hogy a regulátor-régiók rövidebb darabjait építették be különböző típusú transzgenikus konstrukciókba. Ilyen módszerekkel azonosították a cisz-regulátorokban található szabályozó-elemeket: a PRE/TRE-kat, az enhanszereket és a határolóelemeket (lsd. FÜGGELEK). Számos csoport foglalkozott például jól jellemzett PRE/TRE-régiók méretének transzgenikus kísérletekben történő leszüktetésével is. A 2. táblázat mutatja azt a 3 PRE-t, amelyet ilyen megközelítéssel vizsgáltak: a *bxd*-t (Horard és mtsai., 2000) és a *Fab7*-et

PRE	UbxLacZ mintázat- fenntar- tása	<i>miniwhite</i>			Mutációk hatása a transzgén átíródására*			Ektopikus PcG- kötőhely kialakítása
		PFI	Var	SMM	<i>PcG</i>	<i>trxG</i>	<i>Trl</i>	
<i>bxd</i> – 6 kópia BP (Horard és mtsai., 2000)	Igen	NV	Igen	NV	+	-	+	PC
<i>bxd</i> – 4 kópia PF (Horard és mtsai., 2000)	Nem	NV	Igen	NV	+	-	0	PC
<i>Fab-7</i> (Mishra és mtsai., 2001)	NV	Igen	NV	NV	+	NV	+	NV
<i>Fab-7</i> (Déjardin és Cavalli, 2004)	NV	Igen	Igen	Igen	+	-	NV	PC, PH, PHO
<i>engrailed</i> (Americo és mtsai., 2002)	Igen	Igen	Igen	NV	+	NV	NV	NV

2. táblázat A minimális PRE-fragmentumok meghatározására alkalmazott kísérletek (Ringrose és Paro, 2004).

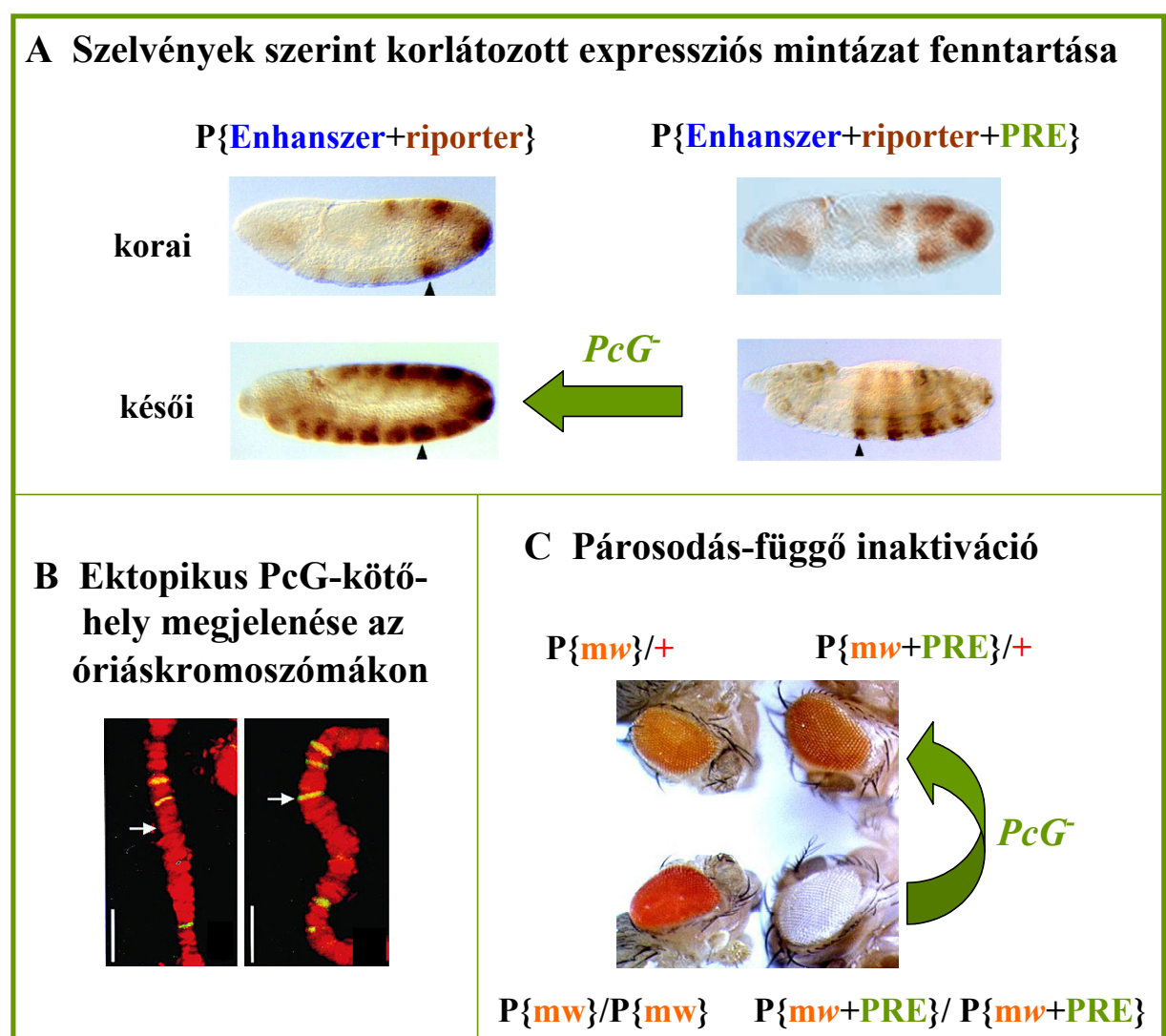
* A mutációk hatását a *miniwhite*-tesztben vizsgálták, kivéve a megjelölt eseteket (**,***). +, a transzgén transzkripciója fokozódik; -, a transzgén transzkripciója csökken; 0, nincs hatás

** A mutációk hatását a *miniwhite*-tesztben és az *UbxLacZ*-tesztben is vizsgálták.

*** A mutációk hatását csak az *UbxLacZ*-tesztben vizsgálták.

NV, nem vizsgálták; PFI, párosodásfüggő inaktiváció; SMM, sejtmemória-modul teszt; Var, variegáció.

(Déjardin és Cavalli, 2004; Mishra és mtsai., 2001) a BX-C-ből, valamint az *engrailed*-et (Americo és mtsai., 2002)]. Több teszt létezik annak eldöntésére, hogy egy adott DNS-darab PRE-ként működik-e (2. táblázat). Talán a legszigorúbb az *UbxLacZ* kísérleti rendszer (1. ábra A), melyben a tesztkonstrukció tartalmazza a „PRE”-t, mellette az *Ubx* gén egy embrionális enhanszerét, valamint egy *Ubx* promótert, amely a *LacZ* riportergént vezérli. Ha a kérdéses fragmentum PRE-aktivitással rendelkezik, képes fenntartani a *LacZ* – az embrionális enhanszer által az embriogenezis elején meghatározott – kifejeződési mintázatát. PRE hiányában vagy PcG



1. ábra A PRE-k vizsgálatára korábban alkalmazott transzgenikus módszerek. Magyarázat a szövegben.

mutáns háttéren a *LacZ* az embriogenezis késői stádiumaitól kezdve derepresszálódik, vagyis az állat elülső testszelvényeiben is kifejeződik. Mivel az *Ubx* promóter is tartalmaz PRE-kra jellemző kötőhelyeket (Americo és mtsai., 2002), amelyeken keresztül a PRE és a promóter valószínűleg kölcsönhatnak, ez a módszer valójában a csak az *Ubx* promóter jelenlétét feltételezve alkalmas a PRE minimális szakaszának meghatározására. Az *UbxLacZ* kísérleti rendszerben egyedül az *engrailed* PRE-t használták egyszeres kópiaszámban a minimális PRE meghatározására (2. táblázat, 9. oldal). A *bxd* PRE esetén a tesztelendő fragmentumokat többszörös kópiaszámban építették a tesztkonstrukcióba (Horard és mtsai., 2000), ezzel nyilvánvalóan egy még inkább mesterséges „szabályozóelemet” alkottak meg, amely nem feltétlenül tükrözi a valódi PRE természetét. Emiatt ezek a kísérletek a legideálisabb esetben is csak a PRE-t alkotó kötőhelyek természetét, és nem a minimális számát képesek meghatározni. A többszörös kópiaszámmal próbálták kivédeni az adott kromatinkörnyezet transzgenikus inszertre gyakorolt hatásait. Ismert ugyanis, hogy a különböző helyekre épült transzgének különbözőképpen viselkednek; ez a hatás annál erősebb, minél kisebb a felhasznált „PRE”-fragmentum.

Két másik PRE-teszt a piros szemszínért felelős *miniwhite* riportergént használja (2. táblázat, 9. oldal). Ha egy PRE-t a *miniwhite* mellé helyezünk a konstrukcióban, ennek a felnőtt legyek szemszínére nézve általában kétféle következménye van: a párosodásfüggő inaktiváció (PFI) (1. ábra C) és a variegáció (Var). A párosodásfüggő inaktiváció azt jelenti, hogy a PRE-t hordozó transzgénre homozigóta (két kópia) legyek szeme – a csökkent *miniwhite*-expresszió miatt – világosabb színű, mint a heterozigótáké (egy kópia). Úgy gondolják, ezt a jelenséget a párosodó PRE-kon szerveződő magasabbrendű PcG komplexek okozzák. A variegáló szemben nagyobb, piros és fehér színű foltok váltogatják egymást, ami annak köszönhető, hogy a *miniwhite* riportergén véletlenszerűen csendesítve van bizonyos sejtvonalakban, másokban pedig nincs. A *miniwhite*-ra alapuló módszerekkel többé-kevésbé azonosíthatók a PRE-aktivitással rendelkező DNS-szakaszok, azonban csak a csendesítőkéesség ellenőrizhető velük, a mintázatfenntartó képesség nem, emiatt kevésbé szigorúak, mint a *LacZ*-teszt. Az eredményeket megerősíti, ha a géncsendesítés PcG- ill. *trxG*-függő: ekkor a tesztelt DNS-szakasz nagy valószínűséggel valóban tartalmaz olyan szekvenciákat, amelyek mindkét fehérjecsoportra „válaszolnak”.

A sejtmemória-modul (SMM; Cellular Memory Modul, CMM) tesztben csak a *Fab-7* minimális PRE/TRE-t vizsgálták (2. táblázat, 9. oldal). Ebben az esetben a tesztkonstrukció tartalmaz egy enhanszert, amely segítségével mesterségesen aktiválható a *miniwhite* gén egy rajta áthaladó, gyors transzkripcióval. Egy PRE/TRE jelenlétében ez a transzkripció sok sejtosztódáson keresztül fennmarad (Cavalli és Paro, 1998). A minimális *Fab-7* PRE/TRE képes volt fenntartani a transzkripciót ebben tesztben, a minimális *Fab-7*-szakasz egy belső, kisebb darabja azonban már nem.

A transzgenikus környezetben végzett PRE-vizsgálatokat sokszor kiegészítik még egy módszerrel. Ha egy fragmentum a beépülés helyén létrehoz egy ektopikus PcG-kötőhelyet a politén kromoszómán (1. ábra B, 10. oldal), ez azt jelenti, hogy a kérdéses szekvencia képes specifikusan kölcsönhatni az adott PcG fehérjével. A 2. táblázat (9. oldal) mutatja, hogy a *bxd* és *Fab-7* PRE-k képesek ektopikus kötőhely kialakítására, az *engrailed* PRE-t azonban nem vizsgálták ilyen szempontból.

A 2. táblázatban (9. oldal) látható egy példa arra, hogy a transzgenikus PRE-tesztek sokszor egymásnak ellentmondó eredményeket adnak: Horard és mtsai. (2000) kísérleteiben a két legaktívabbnak talált PRE-szakasz (BP és PF) közül a PF-fragmentum 4-szeres kópiában variegáló szemszínt okoz és ektopikus PcG-kötőhelyként viselkedik, viszont nem képes a LacZ megfelelő kifejeződési mintázatának fenntartására. A PF-fragmentumot ellenanyaggal sem tudták precipitálni. Ezenkívül egyetlen minimális PRE-szakaszt sem vizsgáltak meg minden módszerrel; könnyen előfordulhat, hogy ha ezt megtették volna, további ellentmondásokat is felfedeztek volna. Részben emiatt és az alkalmazott módszerek hátrányosságai miatt nem biztos, hogy valódi minimális PRE-kat azonosítottak a felsorolt kísérletekben. Igaz ugyan, hogy ezek a kis DNS-szekvenciák mindannyian rendelkeznek PRE-szerű tulajdonságokkal, amelyekkel más, velük szomszédos fragmentumok nem rendelkeznek. Ezen kísérleti megközelítésekkel azonosítani lehet a PRE-k helyét a DNS-szekvenciában, azonban nem alkalmasak annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy hogyan működnek a PRE-k az eredeti kromoszomális környezetükben. A korábban alkalmazott kísérleti megközelítések hiányosságai olyan módszerek kifejlesztésére sarkallták csoportunkat, amelyek lehetővé teszik a PRE/TRE-k „valóságosabb”, *in situ* tanulmányozását.

A PcG fehérjék PRE-khoz kötődése tesztelhető sejtenyészetből, egész embriókból ill. imágókorongokból származó sejtmagok formaldehiddel illetve UV-sugárzással történő

keresztkötésével is (Cao és mtsai., 2002; Kahn és mtsai., 2006; Orlando és mtsai., 1998; Strutt és mtsai., 1997). Noha ezzel az *in situ* alkalmazható módszerrel megerősíthetők és kiegészíthetők a transzgenikus PRE-tesztek eredményei, a PRE-k felépítését és működését nem tudták felderíteni vele. Korábban a PRE-kat eredeti pozíciójukban szekvenciaszinten tanulmányozni csak abban az esetben lehetett, ha „véletlenül” rendelkezésre állt egy, a PRE-hoz nagyon közel lévő, más szabályozóelemet nem érintő mozgó genetikai elem-beépülés (Mihaly és mtsai., 1997). Egy ilyen elem mobilizációjával, fáradságos munkával lehetséges volt *in situ* PRE-deléciókat létrehozni. A technika további hátránya, hogy a deléciók mérete nem tervezhető. E kísérletsorozatból és a PcG mutációk fenotípusaiból arra következtethetünk, hogy egy PRE önmagában történő eltávolítása valószínűleg valamelyik homeotikus gén ektopikus kifejeződését okozza. Ebből adódóan egy vagy több szelvény a normálisan hátrébb található testszelvényekre fog hasonlítani (poszterior irányú transzformációk), azonban nem egyértelmű például, hogy mely szelvények lesznek érintettek. A várható fenotípus megítélésének tekintetében nem segít a néhány rendelkezésre álló, PRE-t eltávolító, több kb nagyságú deléció sem, mivel ezek a PRE-n kívül más szabályozó elemeket (pl. enhanszert, TRE-t) is eltávolítanak. Az egymástól eltérő funkciójú szabályozóelemek sokszor tapasztalható közelségére példa, hogy a TRE-kat a PRE-k területére illetve azok közelébe térképezték. Sőt, a legtöbbet tanulmányozott *bxd* PRE-ban 3 beékelődött TRE-t találtak. Emiatt nem meglepő, hogy a PRE/TRE-kat sokszor egyszerűen PRE-nak (Chan és mtsai., 1994) vagy sejtmemória-modulnak (cellular memory module, CMM) (Cavalli és Paro, 1998) is nevezik. A TRE-khoz – melyeket a legtöbb esetben tehát nem különítettek el szekvenciaszinten a PRE-któl – Trithorax csoportba tartozó transzkripciós aktivátorok kötnek, így a PRE/TRE régiók a homeotikus gének repressziója mellett azok aktivációjához is szükségesek (Poux és mtsai., 2002; Tillib és mtsai., 1999). A TRE-k templátul szolgálhatnak kis nem kódoló RNS-ek kötődéséhez is, melyek Sanchez-Elsner és mtsai. (2006) szerint homeotikus gén aktivátorokat vonzanak a TRE-hoz. Mindezekből következően lehetséges, hogy a PRE/TRE-k kettős, egymással ellentétes szerepüket eddig ismeretlen módon, szorosan összehangolva töltik be: egymás működésének helyi gátlása révén egyes szelvényekben represszálják, másokban pedig aktiválják a célgént. Hogy közelebb kerüljünk a PRE-k (és TRE-k) működésének megértéséhez, csoportunkban kidolgoztunk egy új típusú génkonverzió alapuló technikát, amellyel végrehajtottuk a *bxd* PRE/TRE 3 kb nagyságú szakaszának részletes *in situ* deléciós analízisét. Módszerünk továbbfejlesztésével elemeztük, hogy a transzgenikus kísérletek szerint a

PRE-k felépítésében fontos kötőhelyek eredeti környezetükben milyen mértékben járulnak hozzá a *bxd* PRE működéséhez.

A PcG fehérjék és komplexek

Az első PcG mutációkat, az *extra sex comb*-ot (*esc*) és a *Polycomb*-ot (*Pc*) az 1940-es években azonosították *Drosophila*-ban (1. táblázat, 5. oldal). Ahogy a nevük is sejteti, ezen mutációk következtében a hím legyek 2. és 3. lábán is szex fésűk (sex comb) fejlődnek szemben a vad típusú állattal, amely csak az 1. lábán hordozza ezeket a jegyeket. Hasonló fenotípusokat tanulmányozva genetikai kísérletekben megállapították, hogy a *PcG* gének mutánsai erősítik egymás homeotikus fenotípusát. Ezt igazolják azok az eredmények is, melyek szerint a PcG fehérjék 3 különböző fehérjekomplexbe rendeződnek: a PRC1, a PRC2 és a PHORC komplexekbe (1. táblázat, 5. oldal).

Az 1-2 mDa tömegű *Drosophila* PRC1 (Polycomb Repressing Complex 1) központi része és ennek egér megfelelője rekonstruálható 4 fehérje [Polycomb (PC), Polyhomeotic (PH), Posterior Sex Combs (PSC), Sex Combs Extra (SCE) vagy másnéven RING] együttes kifejeztetésével ízeltlábú sejtekben (Francis és mtsai., 2001; Lavigne és mtsai., 2004). Fontos megjegyezni, hogy ez a komplex bár képes gátolni a nukleoszóma-átrendeződést (remodeling) – elsősorban a PSC-nek köszönhetően – *in vitro*, nem köti jobban a PRE-kat, mint bármely más szekvenciát, vagyis nincs szekvencia-specifitása. Az SCE/RING fehérjék ubiquitin-ligáz aktivitásuk révén valószínűleg ubiquitinálni képesek a 2A hisztont (H2Aub1) (Wang és mtsai., 2004), ez a módosítás pedig elősegíti az inaktív génekre jellemző H3 hisztin 27. lizinjének trimetilációját (H3K27me3) (ld. PRC2 komplex). A 0-12 órás *Drosophila* embriókból tisztított PRC1 komplex az említett komponenseken kívül tartalmazza még a Zeste és a Sex Comb On Midleg (SCM) fehérjéket, a HSC-4 chaperont, valamint jónéhány transzkripciósfaktort is (Saurin és mtsai., 2001). A *zeste* null mutánsok életképesek és semmilyen *PcG* fenotípust nem mutatnak (Goldberg és mtsai., 1989), ami arra utal, hogy *in vivo* a PRC1 valószínűleg a Zeste fehérje nélkül is jól működik. Ezzel ellentétben az SCM egyértelműen szükséges a PcG-közvetítette géncsendesítéshez és stabilan integrálódik a PRC1 komplexbe rekonstitúciós kísérletekben, noha embrióban általában nem a komplexben található meg (Peterson és mtsai., 2004).

Több csoportnak egymástól függetlenül sikerült tisztítania a 600 kDa tömegű PRC2 komplexet *Drosophila* embriókból (Czermin és mtsai., 2002; Müller és mtsai., 2002). Minden esetben a komplex stabil komponensei voltak az ESC, az Enhancer of Zeste [E(Z)] és a Suppressor of Zeste 12 [SU(Z)12] fehérjék. A tisztítás körülményeitől függően ezekkel együtt tisztítódtak más járulékos fehérjék is. A PRC2 komplex az E(Z) SET doménje segítségével képes metilálni a H3 hiszton 9. és/vagy 27. lizin aminosavát. A PRC2 komplexek egy része tartalmazza a Polycomb-like (PCL) fehérjét is, melynek funkciója egyelőre ismeretlen (O'Connell és mtsai., 2001; Tie és mtsai., 2003), viszont szükséges a PcG-közvetítette géncsendesítéshez. Ez a komplex evolúciós értelemben valószínűleg ősi, mint a PRC1, hiszen központi fehérjéinek homológjai megtalálhatók a növényekben és a *C. elegans*-ban is. Mindkét komplexre jellemző, hogy bár katalitikus aktivitásuk egy-egy adott alegységhez köthető, megfelelően csak a teljesen összeállt komplex formájában képesek működni (Müller és Kassisi, 2006).

A PHORC (PHO Repressive Complex) (Klymenko és mtsai., 2006) egyszerre rendelkezik szekvenciaspecifikus DNS-kötő aktivitással (PHO alegység) és mono- illetve dimetilált hisztonfarkakat (H3K9me1, H3K9me2, H4K20me1, H4K20me2) kötő aktivitással (dSFMBT). A dSFMBT egy nemrégiben felfedezett PcG fehérje, amely elengedhetetlen a PcG-közvetítette géncsendesítéshez.

A PcG komplexek biokémiai tisztításával azonosítható az a minimális fehérjekészlet, amelyek egymással vagy a kromatin alkotóelemeivel erős kölcsönhatásban állnak. A komplexek további komponenseinek azonosítására egy másik módszer, a koimmunoprecipitáció alkalmas. Egyre több adat mutat arra, hogy a komplexek működése és összetétele szövetenként (Otte és Kwaks, 2003) illetve célgénenként (Rastelli és mtsai., 1993; Strutt és mtsai., 1997) változhat. Talán éppen a különböző kísérletekben azonosított járulékos komplexalkotó fehérjéknek, ill. genetikai interakciót mutató egyéb PcG fehérjéknek köszönhető ez a különbség.

A TrxG komplexek legfontosabb tulajdonságai

A *trx* gént – mint a homeotikus gének pozitív szabályozóját – Ed Lewis jellemezte először 1968-ban. Az 1980-as években további *trxG* mutációkat fedeztek fel az extra szex fésű (*esc*) fenotípus szupresszoraiként. Úgy tűnik, számos *trxG* fehérjének általános transzkripciószabályozó szerepe van (Collins és Treisman, 2000; Smith és mtsai., 2004) (1. táblázat, 5. oldal). Ez alól kivételt képez a TRX és az ASH1 fehérje, amely specifikusan a PRE/TRE-knál

tevékenykedik az epigenetikus génexpresszió-szabályozásban (Chinwalla és mtsai., 1995; Rozovskaia és mtsai., 1999). Napjainkig 4 – különböző kromatinmódosító tulajdonságokkal rendelkező – TrxG komplexet tisztítottak *Drosophila* embriókból (Simon és Tamkun, 2002) (1. táblázat, 5. oldal).

A 2 mDa tömegű BRM komplex a Brahma (BRM), Moira (MOR) és OSA fehérjéken kívül még legalább 4 járulékos fehérjét tartalmaz. A BRM komplex nagymértékben hasonló az élesztőben található SWI/SNF nukleoszóma-átrendező (remodeling) komplexhez. Maga a BRM fehérje ATP-ázként működve szolgáltatja az energiát a hisztonok mozgatásához. Az emberben több hasonló komplexet azonosítottak (Papoulas és mtsai., 1998). *Drosophila*-ban is két különböző verziója ismeretes ennek a komplexnek (Mohrmann és mtsai., 2004).

Az Absent, Small or Homeotic Discs 1 és 2 (ASH1 és ASH2) fehérjéket tartalmazza két másik TrxG komplex, melyek 2 mDa illetve 500 kDa tömegűek. A negyedik az 1 mDa tömegű TAC1 komplex, mely a TRX fehérjéből, a CBP (CREB binding protein) hiszton acetiltranszferázból és az Sbf1 antifoszfátázból épül fel. Az ASH1 és TRX SET doménje hiszton-metiltranszferáz aktivitást kölcsönöz ezeknek a fehérjéknek: elsősorban a H3 hiszton 4. lizinjéhez (H3K4) kapcsolnak specifikus módon metilcsoportot (Beisel és mtsai., 2002; Smith és mtsai., 2004). A H3K4 metiláció az aktív kromatinnal asszociált.

Van-e a PRE/TRE-knak konszenzus szekvenciája?

Mihály és mtsai. jelentős lépéseket tettek a PRE-k szekvencaszinten történő definiálása felé, hiszen elkészítették az első *in situ* PRE-deléció (Mihály és mtsai., 1997) és a különböző PRE-k szekvencia-összehasonlításaival felfedezték a PRE-k egyik fő építőkövét, PHO-kötőhelyet (Mihály és mtsai., 1998). Ha megvizsgáljuk, van-e valami közös a minimális PRE-szekvenciákban, megállapíthatjuk, hogy meghatározott távolságokban PHO/PHOL-, Zeste- és GAF/PSQ-kötőhelypárokat tartalmaznak (2. ábra A,B,C). A többi potenciális PRE szekvencia-elemzése kimutatta, hogy majdnem minden PRE tartalmaz a fent említett minden motívumfajtából legalább egyet, a kötőhelyek száma és sorrendje azonban változó (Ringrose és mtsai., 2003). A kötőhelyek pontos elhelyezése valószínűleg fontos a kooperatív illetve kompetitív fehérje-kötések létrejöttéhez. Erre utalnak a GAF és a PHO fehérjékkel végzett *in vitro* kooperatív kötési kísérletek (Katsani és mtsai., 1999; Mahmoudi és mtsai., 2003). 5 bp

mtsai., 1999). (1-6. = a *bxd* PRE alfragmentumai; en = az *engrailed* PRE PHO-kötőhelyet tartalmazó része; + = kötődik; - = nem kötődik)

elcsúszás egy adott kötőhelyet a DNS-hélix másik oldalára helyezne át, amely valószínűleg drasztikusan megváltoztatná a kötőhely hozzáférhetőségét a kromatinban.

Összefoglalva: korábbi tesztekben meghatározott bármely PRE-szekvenciát is vesszük alapul, BLAST típusú homológiakereséssel nem lehetséges megtalálni más PRE-kat a légy genomjában. A PRE-knak tehát nincs a klasszikus értelemben vett, bevált módszerekkel meghatározható konszenzus szekvenciája, ami megnehezíti a vizsgálatukat. Az ismert PRE-k tanulmányozásával és *in silico* tesztelésével megalkották a PRE-prediktáló programot (Ringrose és mtsai., 2003). A programmal bizonyították, hogy a GAF/PSQ, a Zeste és a PHO/PHOL DNS-kötő faktorok kötőhelyeinek megfelelő közelségben és számban történő elhelyezése *in silico* elegendő feltétele annak, hogy megtaláljanak több, már ismert PRE-t a genomban. A vizsgálatot kiterjesztve az egész genomra számos potenciális PRE-t prediktáltak, melyek méretüket tekintve 500-900 bp hosszúnak adódtak. Ezeket illetve az ismert PRE-kat tanulmányozva megállapították, hogy a fent említetteken kívül sokszor tartalmaznak még három további jellemző szekvencia-motívumot is (2. ábra D). E három motívum gyakori előfordulását a BX-C-ben leírta egy másik kutatócsoport (Lewis és mtsai., 1995) is korábban, igaz, a PRE-k működésében betöltött szerepük mindmáig tisztázatlan maradt. A *Drosophila* genom microarray technika kifejlesztése ugyanakkor lehetővé tette a PcG fehérjék kötődésének kísérletes vizsgálatát is a teljes genom szintjén (Nègre és mtsai., 2006; Schwartz és mtsai., 2006; Tolhuis és mtsai., 2006). Ezen vizsgálatok eredményei – mivel különböző szöveteket feldolgozó kísérletekből származnak – közvetlenül nem hasonlíthatók össze, viszont bármelyiket is nézzük, nagyon korlátozott átfedést találunk a ChIP-on-chip eredmények és az *in silico* prediktált PcG-kötőhelyek között. Egy 2005-ben megjelent közlemény szerint a PRE-kban megtalálható GAAAA kötőhelyhez – amely a fent említett három addicionális motívum egyikének egy változata (2. ábra D/D) – specifikusan kötődik a DSP1 fehérje, és ez a kötés vonzza a PRE-hoz a PHO-t és a többi PcG fehérjét (Déjardin és mtsai., 2005). Ez a munka elegáns megoldást adhatott volna arra a kérdésre, hogy a PHO/PHO-like- és GAF/PSQ-kötőhelyeken kívül még milyen szekvenciaelemek szükségesek egy PRE létrehozásához, illetve ezekhez milyen transz faktorok kötődnek, ha nem mondana ellent több kísérleti adatnak is. A DSP1 fehérje DNS-kötő doménjét ugyanis két high mobility group (HMG) régió alkotja, amelyről kimutatták, hogy szekvenciaspecifitás nélkül kötődik a

DNS kis árkában (Thomas és Travers, 2001). Ezenkívül a *dsp1* homozigóta null mutáns életképes, fertilis és nem derepresszált a *Hox* gének kifejeződése benne, sőt, gyenge *trxG* fenotípust mutat (Decoville és mtsai., 2001).

Mit tudunk a PRE/TRE-k működéséről?

A több évtizedes kutatómunka és az általa feltárt tekintélyes információmennyiség ellenére ma sem világos, a PcG/TrxG-rendszer hogyan szabályozza a géneket. Segít a tájékozódásban, ha sorba vesszük azt a 4 feladatot, amelyet a rendszernek teljesítenie kell. Paradox módon ahhoz, hogy betekintést nyerhessünk a sejtmemória molekuláris mechanizmusába, olyan megközelítéseket kell alkalmaznunk – legalábbis egyelőre –, amelyek kevésbé veszik figyelembe, hogy a PcG komplexek különböző összetételűek az egyes célgének esetén (Rastelli és mtsai., 1993; Strutt és Paro, 1997), sőt a PcG fehérjék kifejeződési mintázata szövetenként és egyedfejlődési stádiumonként is (Furuyama és mtsai., 2003; Otte és Kwaks, 2003; Sewalt és mtsai., 2004) változik.

Először is ahhoz, hogy a PcG és TrxG fehérjék betölthessék fenntartó funkciójukat, meg kell találniuk a szabályozandó géneket a PRE-khoz való kötődésen keresztül. E problémakör megközelítésére végeztek olyan kísérleteket, amelyekben a PC és a TRX fehérjék kötődését vizsgálták a BX-C-ben (Orlando és mtsai., 1998). Megállapították, hogy az embriogenezis első 5 órájában – körülbelül a szegmentációs géntermékek megjelenésével egyidőben – ezek a fehérjék erőteljesen kötődnek a PRE/TRE-khoz. Van egy olyan PcG fehérje (ESC), amely csak az oogenezis során és az egyedfejlődés első 4 órájában fejeződik ki (Poux és mtsai., 2001), ezért valószínűleg szerepe van a PcG/TrxG-rendszerre történő „átkapcsolásban”. Korai embrionális kivonatból a PC koimmunoprecipitálódik az ESC, az E(Z) és a PHO fehérjékkel, de a PH, PSC és GAF fehérjékkel nem. Vajon hogyan töltődnek fel a PRE/TRE-k PcG és TrxG fehérjékkel ebben a korai stádiumban? Tudjuk, hogy az eredeti környezetükből eltávolított transzgen PRE/TRE-kon működőképes PcG/TrxG komplexek képesek szerveződni (Americo és mtsai., 2002; Déjardin és Cavalli, 2004; Horard és mtsai., 2000), tehát a válasz ezen DNS-szakaszok szekvenciájában ill. az azt specifikusan kötő fehérjékben keresendő (2. ábra, 17. oldal).

Mi horgonyozhatja le a PcG komplexeket a PRE-khoz? Két PcG fehérje ismert, amely szekvenciaspecifikus módon kötődik a PRE-khoz: a PHO és a PHOL. Kötőhelyeik jelenléte elengedhetetlenül szükséges a PRE-közvetítette represszióhoz (Fritsch és mtsai., 1999). A PHO

és a PHOL redundáns módon hatnak, de ha mindkét fehérjét eltávolítjuk, a *Hox* génnek erősen derepresszálódnak (Brown és mtsai., 2003; Klymenko és mtsai., 2006). Ha a PHO PC-interakciós doménjét mesterségesen odakötik a riportergénhez, összeszerelődik a csendesítő komplex (Mohd-Sarip és mtsai., 2002). Érdekes módon a PC, PH, PSC és a SU(Z) teljes fehérjék is mind képesek erre hasonló kísérletekben (Poux és mtsai., 2001). Ezenkívül a PHO (de nem a PHOL) PC-interakciós doménjén keresztül képes kötődni az E(Z)-hez is *in vitro* kísérletekben (Wang és mtsai., 2004). Ugyanezen szerzők a PcG komplexek hierarchikus összeszerelődésére felállítottak egy modellt tenyésztett sejtekből végzett kromatin-immunoprecipitáció segítségével. Eszerint a PHO az E(Z)-vel együttműködve vonzza a PC-t a *bx*d PRE-hoz, ugyanakkor a PC az *Ubx* promóterhez is kötődik, de a másik két fehérjétől függetlenül. A tenyésztett sejtekben zajló folyamatok azonban nem feleltethetők meg egyértelműen egyik vad típusú *Drosophila* szövetnek sem, erre mutatnak azok az eredmények is, melyek szerint az előzőben a PHOL-nak nincs szerepe, az utóbbiban viszont van. Ugyanis harmadik stádiumú lárvákból származó *pho/pho-like* mutáns imágókorongokban sem a promóteren, sem a *bx*d PRE-n nem tapasztaltak PC- vagy E(Z)-kötést, míg az egyszeres mutánsokban mindkét fehérje normálisan kötődik. Az imágókorongokban ez a redundancia az egyedfejlődés egy késői szakaszában jöhet létre, és talán az embrionális szövetekre – melyekből a tenyésztett sejtek származnak – nem jellemző. Ha a tenyésztett sejtek valóban tükrözik az embrióban zajló folyamatokat, akkor úgy tűnik, hogy a PHO – és nem a PHO-like – szükséges a PC PRE-hoz vonzásához, a promóterhez viszont más mechanizmus szerint kötődik a PC. Újabb eredmények szerint a PHO és a PRC1 kooperatív módon segítik egymás PRE-hoz való kötődését; ebben a folyamatban PHO meghajlítja a DNS-t (Mohd-Sarip és mtsai., 2005).

A *Trl* gén által kódolt GAF tenyésztett sejtekben kolokalizálódik a PcG fehérjékkel a PRE-knál (Strutt és mtsai., 1997), és embrionális kivonatokból koimmunoprecipitálható a PC fehérjével (Horard és mtsai., 2000). Több transzgenikus tanulmány mutat rá továbbá arra, hogy a GAF szükséges a riportergén repressziójához (Hagstrom és mtsai., 1997; Hodgson és mtsai., 2001; Horard és mtsai., 2000). Ennek meglehetősen ellentmond egy másik kísérlet, amely szerint a (GA)n kötőhelyek elrontása nem vezet transzkripció változáshoz (Brown és mtsai., 2003). A GAF szerepét a PRE-működésben megkérdőjelezi az is, hogy az imágókorongokban lokálisan létrehozott *Trl* mutáció nem befolyásolja a homeotikus génextpressziót (Bejarano és Busturia, 2004; Brown és mtsai., 2003). A helyzetet tovább bonyolítja, hogy kimutatták, a GAF szükséges

a homeotikus gének megfelelő aktivációjához embrionális korban (Bejarano és Busturia, 2004). Genetikai értelemben a GAF – a homeotikus gének közötti bonyolult keresztszabályozási mechanizmusok miatt – lehet a *PcG* és a *trxG* fenotípusok erősítője is egyszerre (Kennison, 2004), ezért érzékelhető egyszer aktivátorként, másszor represszorként. A folyamat molekuláris hátterére utal az az *in vitro* adat, mely szerint a GAF képes elősegíteni a fehérjék kromatinba csomagolt DNS-hez való hozzájutását (Becker, 1995), vagyis lehetővé teszi a *PcG* (Mahmoudi és mtsai., 2003; Mulholland és mtsai., 2003) és *TrxG* (Déjardin és Cavalli, 2004; Poux és mtsai., 2002) fehérjék PRE/TRE-khoz való hozzáférését. Nem tisztázott tehát, hogy a GAF a kezdeti feltöltőkomplex részét képezi vagy később vesz részt az aktiváló/csendesítő folyamatban. Van azonban egy olyan DNS-kötő fehérje (PSQ), amelynek szekvencia-specifitása azonos a GAF-éval, és együtt tisztul az egyik *PcG* komplexszel (Huang és Chang, 2004; Huang és mtsai., 2002). A PSQ PRE-k közvetítette géncsendesítésben betöltött szerepére utal az is, hogy genetikailag a *ph* és a *Pc* fenotípusok erősítőjeként viselkedik (Hodgson és mtsai., 2001; Huang és mtsai., 2002). Mivel a PSQ szekvenciaspecifitása megegyezik a GAF-éval (2. ábra A, 17. oldal), lehetséges, hogy a GAF és a PSQ kooperálnak vagy kompetálnak ugyanazon kötőhelyek megszerzéséért; ez egyben magyarázatot adhat a GAF-ral kapcsolatos ellentmondásos adatokra is (Hodgson és mtsai., 2001).

A Zeste fehérje kötőhelyeit (2. ábra A, 17. oldal) szintén megtalálhatjuk a PRE/TRE-szekvenciákban. Az óriáskromoszómán több mint 60 helyen kötődik, ebből 53 esetben kolokalizálódik a *PcG* fehérjékkel (Rastelli és mtsai., 1993). A Zeste együtt tisztítódik egy *PcG* komplexszel (Saurin és mtsai., 2001), valamint hozzáadva a rekonstruált PRC1 komplexhez, elősegíti annak Zeste kötőhelyeket tartalmazó kromatintempláthoz való kötődését (Mulholland és mtsai., 2003). Az irodalomban – a GAF-hoz hasonlóan – meglehetősen ellentmondásos adatokat találhatunk a Zeste szerepére vonatkozóan: egyes szerzők szerint aktiváló (Déjardin és Cavalli, 2004; Laney és Biggin, 1997), mások szerint represszálo (Hur és mtsai., 2002) hatása van. Ezen eredmények értékelésekor figyelembe kell vennünk, hogy az *fs(1)h* gén által kódolt FSH-S-ről kimutatták: specifikusan kötődik az *Ubx* proximális promóterében található Zeste-kötőhelyekhez, és – a TRX és ASH1 fehérjékkel együttműködve – fontos szerepet játszik az *Ubx* aktivációjában (Chang és mtsai., 2007).

A Grainyhead (Grh) vagy más néven Neuronal Transcription Factor 1 (NTF-1) kötőhelye (2. ábra A, 17. oldal) nem esszenciális, de jelenléte jobb represszorrá teszi a PRE-t (Blastyák és

mtsai., 2006). Ez annak köszönhető, hogy mind a PHO, mind a Grh a másik jelenlétében nagyobb affinitással köt a saját kötőhelyéhez. A homozigóta *grh* mutáció letális, az ilyen embriók *Ubx* kifejeződési mintázata azonban normális (Bray és Kafatos, 1991), valamint a felnőtt állat epidermiszén létrehozott mutáns *grh* klónok sem mutatnak homeotikus transzformációkat (Lee és Adler, 2004).

Világos tehát, hogy a PHO-kötőhelyeken kívül más DNS-elemekre is szükség van egy PRE létrehozásához, azonban az ezeken keresztül ható transzhatású faktorokat még nem sikerült egyértelműen azonosítani. Több esetben láttuk, hogy a rendszerre nagyfokú redundancia jellemző: több fehérjét kellene eltávolítani egyszerre ahhoz, hogy pontos szerepüket vizsgálni lehessen. Ezenkívül lehetnek még eddig felfedezetlen – redundáns vagy nem redundáns – DNS-kötő faktorok is. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy a PRE/TRE-kra jellemző kötőhelyeknek nemcsak a száma és sorrendje, de szekvenciája is nagy változatosságot mutat (2. ábra A, E, 17. oldal)

A PcG fehérjék kötésén kívül szintén fontos feladat egy „elkötelezetlen” PRE/TRE számára az őt tartalmazó cisz-regulátor – gap és pair-rule géntermékek által előzőleg finomhangolt – állapotának érzékelése. Transzgenikus kísérletekből úgy tűnik, hogy a PRE/TRE alapértelmezett működési módja a csendesítés (Sengupta és mtsai., 2004). Ha azonban a TRX és ASH1 TrxG fehérjék „színre lépnek”, a célgén aktiválódik (Klymenko és Müller, 2004). Ez alapján a probléma leszűkíthető arra a kérdésre, hogy a promóter aktivációja hogyan függ össze a TRX és az ASH1 kötődésével. Kromatin-immunoprecipitációval kimutatták, hogy a TRX átmenetileg kötődik a BX-C-ben található mindhárom homeotikus gén promóteréhez az embrionális fejlődés 2-5. órájában. A PC egy kicsit később, az embriogenezis 5-8. órájában kapcsolódik a promóterhez, és a későbbi egyedfejlődés során végig ott marad (Orlando és mtsai., 1998). A folyamatot a promóternél található PRE/TRE-szerű szekvenciák közvetlenül is mediálhatják, azonban a mechanizmus – mint ahogy fentebb a PC esetén már láttuk – különböző lehet a „valódi” PRE/TRE-khoz képest. Ezek az egész embriókon végzett kísérletek nem tudnak különbséget tenni az aktív és inaktív promóterek között, azonban rámutatnak, hogy a korai promóter-TrxG/PcG kölcsönhatások léteznek és dinamikusan változnak, stabilá csak a „germband extension” stádiumban (5-8. óra) válnak, amikortól a PcG/TrxG-rendszernek önállóan kell fenntartani a célgén megfelelő transzkripció mintázatát. Érdekes módon a TRX akkor kötődik átmenetileg a promóterhez, amikor a homeotikus transzkripció is beállítódik. Lehetséges, hogy

ez a fehérje valahogyan képes „leolvasni” a promóter állapotát és hiszton-metiltranszferáz aktivitása (Smith és mtsai., 2004) révén megjelölni azt egy „aktív” metilációs kóddal (H3K4) azért, hogy megvédje a PcG inaktíváló hatásától. 2007-ben Chang és mtsai. egy érdekes „láncszemet” tártak fel a folyamatban: az FSH-S fehérje az *Ubx* promóterében található Zeste/FSH-S-kötőhelyekhez kapcsolódva elősegíti a célgén aktivációját. Több jel utal arra, hogy a távoli PRE/TRE-kal való kapcsolat megteremtésében ez a fehérje kulcsszereplő. Valószínűleg közvetve vagy közvetlenül kapcsolódik a TRX és ASH1 fehérjékhez, valamint Ser/Thr-kináz aktivitása és acetilált hisztonokhoz történő kötődése révén továbbítja a „jelet” a cisz-regulátorokról a promóterhez kötődő faktorok felé (Chang és mtsai., 2007).

A másik korai esemény, amely kapcsolatot teremthet promóter és a PRE/TRE-kon kötött fehérjék között, az maga a nem kódoló RNS-ek átíródása a PRE/TRE-kről. Megfigyelték ugyanis, hogy minden egyes PRE/TRE átíródik pontosan abban az időben és abban a paraszelvény-specifikus (lsd. FÜGGELÉK) mintázatban, ahogyan az általa szabályozott homeotikus gén is (Rank és mtsai., 2002). Több kísérletben is kimutatták, hogy a BX-C-ben található PRE/TRE-k ektopikus átírása aktiválja a TRE-kat, ami a célgén ektopikus aktivációját és következésképpen homeotikus fenotípusok kialakulását eredményezi (Bender és Fitzgerald, 2002; Hogga és Karch, 2002). Nem világos, hogy vajon ez a tulajdonság minden PRE-ra igaz-e. Annyi bizonyos, hogy az aktiváció nem annak az eredménye, hogy a transzkripció következtében a PcG fehérjék leöklődnek vagy nem férnek hozzá a PRE-hoz, hiszen a célgénnek az aktív és a represszált állapotában is folyamatosan kötődnek a PRE-hoz (Papp és Müller, 2006).

A PcG/TrxG-rendszer további feladata az aktív vagy represszált állapot stabil fenntartása. A PcG fehérjék úgy tűnik, a transzkripciós folyamat több lépésére is hatással vannak. *Drosophila* sejt kultúrában például a transzkripciós faktorok kötődnek a promóterhez (Breiling és mtsai., 2001) és a PcG fehérjékhez (Saurin és mtsai., 2001) akkor is, ha az általuk szabályozott gén represszált állapotban van. Mivel a SET domént tartalmazó metiltranszferázok és a RING motívumot hordozó fehérjék a hisztonokon kívül más fehérjéket is képesek módosítani, valószínűnek tűnik, hogy ily módon a transzkripciós apparátus több komponensét is blokkolják (Chuikov és mtsai., 2004; Kagey és mtsai., 2003; Su és mtsai., 2005). Másrészt a PcG hatással lehet magára a polimerázra is: ha egy PRE-t egy hőszokk-promóter által vezérelt riportergén mellé építenek, a gén represszáldódik. A transzkripciós faktorok és a polimeráz is kimutathatók a promóteren, viszont az enzim képtelen szétválasztani a DNS két szálát, a transzkripció nem tud

elindulni (Dellino és mtsai., 2004). A hősokk-promóter azonban speciális eset is lehet, mindenképpen ellenőrizni kell, hogy ez a mechanizmus érvényes-e endogén célgénekre is.

Miután felfedezték, hogy az PRC2 komplex metilálja a H3 hiszton 9. és 27. lizinjét (Cao és mtsai., 2002; Czermin és mtsai., 2002; Kuzmichev és mtsai., 2002; Müller és mtsai., 2002), kimutatták, hogy a PC kromodoménje *in vitro* mindkét metilált hisztonfarkat köti, az utóbbit nagyobb affinitással (Fischle és mtsai., 2003). Az E(Z) metiltranszferáz aktivitásáról bizonyították továbbá, hogy az imágókorongokban szükséges a homeotikus gének megfelelő repressziójához. Ezek a megfigyelések és az, hogy a metilációs jelek kolokalizálódnak a PC-vel a politén kromoszómán elvezettek ahhoz a modellhez, mely szerint a H3K27 és/vagy a H3K9 metilációs jelek egyfajta jelzőrendszerként működnek, melyek a megfelelő helyekre irányítják a PC-t (Fischle és mtsai., 2003; Lachner és mtsai., 2003). Ez a modell azonban egyben azt is jelentené, hogy az E(Z)-nek még a korai embriogenezis során konstitutívan kötődő PC előtt kötődnie és metilálnia kellene a megfelelő hisztonokat. A modellnek ellentmond az a megfigyelés is, mely szerint a PC a promóterhez az E(Z) nélkül kötődik. Ekkor nyertek igazi értelmet az 1990-es évek közepén végzett elegáns kísérletek eredményei, melyek bizonyították: a metilációs jelek nem határozzák meg egyértelmű módon sem a PcG, sem a HP1 (Heterochromatin Protein 1) fehérje (Fischle és mtsai., 2003) eloszlását. A HP1 a centromerikus heterokromatinban helyezkedik el, ahol gyakori a H3K9-metiláció, és ritka a H3K27-metiláció. Létrehoztak egy kiméra fehérjét, amelyben a HP1 kromodoménjét kicserélték a PC kromodoménjére. A hibrid fehérje a centromerikus heterokromatinhoz és az eukromatikus PC-kötőhelyekhez is kapcsolódott. Sőt endogén PcG fehérjéket vonzott a heterokromatinhoz (Platero és mtsai., 1996), és endogén HP1 fehérjéket vitt a PC-helyekhez (Platero és mtsai., 1995). A H3K27-metiláció és a PC-kötődés közötti egyszerű összefüggést cáfolja az a tény is, hogy az inaktív X kromoszómára erősen jellemző a H3K27 metiláció, mégsem mutatható ki rajta a PC (Plath és mtsai., 2003; Sewalt és mtsai., 2004). Egyértelművé vált a kép, amikor kvantitatív ChIP kísérletekkel bizonyították, hogy a PcG komplexeket kötő PRE-kat nem is borítják nukleosómák, csak a szomszédos szakaszokat (Papp és Müller, 2006). Mohd-Sarip és mtsai. kimutatták továbbá, hogy a PHO és a PRC1 kölcsönösen együttműködve alkotnak komplexet hisztonmentes, PRE-t tartalmazó DNS-templáton (Mohd-Sarip és mtsai., 2005).

Vajon akkor mi lehet a szerepe a lizinmetilációnak a represszióban? Érdekes módon az E(Z) kiiktatásával a H3K27-metiláció és a PC-kötődés tovább fennmarad az *Ubx* promóternél,

mint a *bxd* PRE-nál (Wang és mtsai., 2004). Tehát valószínűleg a metiláció mértéke és/vagy a PC-kötés erőssége különböző a két helyen ill. környékén. A stabil metilált hisztonhoz gyenge affinitással kötődik a PC-kromodomén, ez finom kinetikai szabályozásra adhat lehetőséget: a stabil metilációs jel dinamikus, regulálható módon olvasható le (Fischle és mtsai., 2003). A már említett kvantitatív ChIP kísérletekben kimutatták, hogy a H3K27me3 hisztonmódosítás – együtt a H3K9me3 és H4K20me3 módosításokkal – végig megtalálható az inaktív *Ubx* upstream szabályozó-, promóter- és kódoló régiójánál (Papp és Müller, 2006). Ezzel szemben, ha az *Ubx* bekapcsolt állapotban van, a fenti módosítást csak az upstream szabályozó-régiónál találták meg. Ez a felfedezés adta az ötletet a modell megalkotásához, mely szerint a metil-lizin-kötő fehérjék – a PC és a dSFMBT – kulcsfontosságúak az inaktív kromatindomének fenntartása szempontjából. Szekvensspecifikus DNS-kötő fehérjék által a PRE-khoz horgonyzódva a PC és a dSFMBT folyamatosan „figyeli” a környező kromatin metiláltsági állapotát, és oda kötődik, ahol az általa felismert módosítások megtalálhatók. Ezzel a többi PcG fehérjét is „végigviszi” a felismert kromatindoménen, ahol a PRC2-nek lehetősége nyílik trimetilálni a H3K27-t, a PRC1-nek pedig megakadályozni a nukleoszómák átrendeződését (Müller és Kassis, 2006). Eddigi tudásunk alapján tehát a PRE/TRE-k alapértelmezett működése a csendesítés, melynek folyamata a hisztonok megfelelő kromatindoménben történő specifikus módosításai mellett magában foglalja a PRE-PcG és promóter-PcG közötti specifikus kölcsönhatásokat is, nem világos azonban, hogy a géncsendesítésnek melyik esemény az oka és melyik a következménye.

Hogyan történik az aktív állapot fenntartása? Ha egyszer aktiválódott, egy PRE/TRE több sejtgeneráción keresztül fenntartja ezt az állapotot (Cavalli és Paro, 1998). Molekuláris szinten a TRX és ASH1 hiszton-metiltranszferázok, a nukleoszóma-átrendező BRM komplex, a Zeste és a dCBP kötődnek specifikusan az aktív TRE-hoz vagy a megfelelő promóterhez (Beisel és mtsai., 2002; Déjardin és Cavalli, 2004). Ebben az esetben sem ismert az események sorrendje. A BRM sokkal több helyen kötődik az óriáskromoszómán, mint a TRX, a Zeste vagy az ASH1, megerősítve a BRM transzkripció-aktivációban betöltött általános szerepét (Corona és mtsai., 2004). A Zeste aktivációt követően kötődik a PRE/TRE-hoz, amelyet a BRM kötődése követ (Déjardin és Cavalli, 2004; Kal és mtsai., 2000). Ahogy a PcG komplexek a PRE-khoz, a TRX is konstitutívan kötődik a TRE-khoz függetlenül attól, hogy a célgén aktív vagy represszált (Chinwalla és mtsai., 1995; Kahn és mtsai., 2006; Papp és Müller, 2006). Habár a TRX és az ASH1 kötődési mintázata a politén kromoszómán különböző, biokémiai szempontból pedig

különböző komplexek alkotóelemei, mégis együttműködnek, bár valószínűleg csak bizonyos lókuszoknál. A TRX kötődése genetikailag *ash1*-függő, embrionális kivonatból koimmunoprecipitálódnak, valamint mindkettő kötődik a *bxd* PRE/TRE régióhoz *in vivo* (Rozovskaia és mtsai., 1999). Genetikailag az ASH1 és a TRX nem redundáns funkciójuk, hiszen bármelyik hiánya az *Ubx*-expresszió drámai csökkenéséhez vezet, amely a PcG fehérjéknek köszönhető (Klymenko és Müller, 2004). Ez fontos eredmény, mert megmutatja, hogy a PcG visszaállítja a represszált állapotot, hacsak a TRX vagy az ASH1 fehérjék ott nincsenek és nem akadályozzák meg. *PcG/trxG* kétszeres mutáns embriókban az *Ubx* a normális expressziós doménjén kívül is kifejeződik, ami azt jelenti, hogy az *Ubx de novo* aktivációjához nincs szükség TRX és ASH1 fehérjékre. A szerzők arra következtetnek, hogy e két fehérje nem transzkripció koaktivátorként működik – ahogy azt korábban feltételezték –, hanem antirepresszorként, melyre folyamatosan szükség van az egyedfejlődés során, hogy ellensúlyozza a PcG csendesítő hatását. Ezt megerősítette egy CHIP kísérlet is, mely szerint az ASH1 aktív *Ubx* génhez történő kötődése megakadályozza a PRC2-t az *Ubx* promóterénél és kódoló régiójánál található nukleoszómák metilálásában (Papp és Müller, 2006).

Az epigenetikus reguláció talán a legizgalmasabb kérdéseket felvető tulajdonsága, hogy képes „túlélni” a mitózist. Jelenleg messze állunk attól, hogy megválaszolhassuk, a DNS-replikációt és sejtosztódást kísérő drasztikus kromatinszerkezeti átrendeződéseket követően honnan tudják a PcG és TrxG fehérjék, hogy melyik PRE/TRE-nak kell aktívnak és melyiknek inaktívnak lennie. Ugyanis a PcG fehérjék *Drosophila*-ban és emlősben nagyrészt disszociálnak a mitotikus kromoszómákról (Buchenau és mtsai., 1998; Miyagishima és mtsai., 2003). A TrxG fehérjékkel kapcsolatban nem végeztek hasonló kísérleteket. Ha az embriogenezis során aktiválódik egy PRE/TRE, „elfelejti”, hogy valaha inaktív volt és folyamatosan fenntartja a transzkripciót. Ha viszont ugyanez a PRE/TRE késői lárva stádiumban aktiválódik, emlékszik az eredeti represszált állapotára, melybe több sejtosztódás után visszatér (Beuchle és mtsai., 2001; Ringrose és Paro, 2001). Vagyis a PRE/TRE valamikor a korai embriogenezist követően kap egy inaktiváló jelölést, amely – kezdeti aktiváló jel hiányában – sok sejtosztódáson keresztül megőrződik. Az inaktiváció az egyedfejlődés előrehaladtával stabillá válik, melynek hátterében a PcG és TrxG fehérjék kifejeződésének illetve aktivitásának fejlődésspecifikus szabályozása állhat (Furuyama és mtsai., 2003; Sewalt és mtsai., 2004). Későbbi stádiumokban az aktivitási/inaktivitási jel a hisztonok lizin csoportjainak metilációja lehet. Replikációt követően a

metilált hisztonok egyenlően oszlanak el az utódszálak között, ez helyi jelként szolgálhat az őket hordozó DNS-szakasz „feladatára” vonatkozóan. Emellett azonban magukra a PRE/TRE-szekvenciákra is szükség van ahhoz, hogy az inaktív állapot megőrződjön: ugyanis ha egy inaktív PRE/TRE-t mesterségesen eltávolítanak, a represszált állapot gyorsan megszűnik (Busturia és mtsai., 1997; Sengupta és mtsai., 2004).

A PcG és TrxG fehérjék tehát stabil, de nem statikus módon őrzik meg célgénjeik transzkripció állapotát a sejtosztódások során. A tény, hogy az RNS-polimeráz (Dellino és mtsai., 2004) és különböző általános transzkripció faktorok (Breiling és mtsai., 2001) a represszált promótereknél is megtalálhatók, valamint a PcG és TrxG között észlelt kompetíció (Klymenko és Müller, 2004) mind arra utalnak, hogy a PcG és TrxG fehérjék dinamikusan változó, egymással egyensúlyban lévő komplexek formájában kötődnek célgénjeikhez. A helyzet hasonló a HP1 esetéhez, amely állandóan mozog egy adott stabil heterokromatin-doménen belül (Cheutin és mtsai., 2004; Ficiz és mtsai., 2005). Így a PcG/TrxG-rendszer nemcsak a transzkripció memóriát biztosítja, hanem megengedi a másik állapotba történő átkapcsolást is. Elméletben ez a dinamikus egyensúly lehetővé teszi a két szélső – a bekapcsolt és kikapcsolt – állapot közötti finomhangolást is. Erre utalnak azok a megfigyelések is, amelyek szerint sok PcG/TrxG által szabályozott gén kifejeződési szintje és mintázata változik az egyedfejlődés során (Fauvarque és mtsai., 1995; Maurange és Paro, 2002; Ringrose és mtsai., 2003).

Célkitűzések

Csoportunkban egy epigenetikus regulátor szakasz, a *bxd* PRE/TRE funkciójának célzott, *in situ* vizsgálatával foglalkozunk. Mindaddig egyetlen esetben vizsgáltuk PRE-t (*iab-7*) az eredeti kromoszomális környezetében. Ez a kísérlet imprecíz P-elem-kivágódáson alapult, mely módszer számos hátránnyal rendelkezik: az így indukált deléciók mérete véletlenszerű, a folyamat nem irányítható, és nem használható fel a PRE-funkcióhoz fontos, transzgenikus kísérletekben azonosított fehérje-kötőhelyek célzott módosítására sem. Laboratóriumunkban kifejlesztettünk egy új típusú génkonverzió alapuló, hatékony módszert, amely segítségével tervezett módon *in situ* deléció-sorozatot hoztunk létre a *bxd* PRE/TRE 3 kb-os szakaszán belül, ezáltal megvalósulhatott a *bxd* PRE/TRE minden eddiginél nagyobb felbontású funkcionális vizsgálata.

A *bxd* PRE a legintenzívebben tanulmányozott epigenetikus regulátor elem. Korábban elsősorban transzgenikus kísérletekben vizsgálták az őt tartalmazó szabályozó-régió kisebb-nagyobb darabjait. *In situ* megközelítésünkkel kiküszöbölhetők a transzgenikus vizsgálatok hátrányosságai, és reményeink szerint feloldhatók az általuk támasztott ellentmondások is, mint például az, hogy a PRE-aktivitással rendelkező szakaszok a különböző tesztekben eltérő méretűnek adódtak; vagy hogy egyes szakaszok az egyik tanulmányban PRE-ként viselkedtek, míg másokban nem. A *bxd* PRE-ban halmozottan előforduló, konzervált fehérje-kötőhelyek elrontásával meg tudjuk határozni azok pontos szerepét és a PRE-funkcióhoz való hozzájárulásuk mértékét is. Továbbá a *bxd* PRE-t kicserélhetjük más, korábban azonosított PRE-szakaszokra, és megvizsgálhatjuk, hogy az utóbbiak képesek-e betölteni a *bxd* PRE szerepét.

Kizárólag a csoportunk által kifejlesztett technikával lehetséges egy markergén célzott beépítése a genom egy meghatározott pontjára, majd a markergén mellett elhelyezkedő, tetszőleges méretű DNS-szakasz eltávolítása. Kísérleteinkben ilyen módon a *Gal4-VP16* markergént ültettük be a *bxd* PRE/TRE különböző módosított változataiba, majd az így kapott kromoszómát hordozó legyekbe keresztezéssel bevittük az *UAS-eGFP* gént. Az eGFP kifejeződési mintázatának tanulmányozásával információkat nyertünk a lokális kromatinszerkezet változásairól. Az eredményeket összevetettük a *bxd* PRE célgénjének (*Ubx*) kifejeződési mintázatával, ezáltal lehetővé vált a *bxd* PRE epigenetikus csendesítő szerepétől különböző, az enhanszert és a promótert horgonyzó funkciójának vizsgálata.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Drosophila tenyésztési körülmények és keresztezések

A törzseket az általánosan használt kukorica-élesztő alapú táptalajon tartottuk 18 vagy 25°C-on. A keresztezéseket általában tömegtenyészetekben 25°C-on végeztük, az ettől eltérő esetekben az eljárást az adott kísérletnél részletezzük. A mutációk és balanszer kromoszómák leírása megtalálható a Flybase-ben (<http://flybase.bio.indiana.edu>).

PCR és DNS-preparálás

A PCR kísérleteket Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA) és PTC-200 (MJ Research, Cambridge, MA) készülékek segítségével végeztük. A reakciókhoz a *Taq* és *Pfu* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) polimerázok 20 U : 1 U arányú keverékét használtuk. Az alkalmazott primerek és PCR-programok részletes leírását kérésre biztosítjuk. A teljes genomon végzett Southern blotting-hoz az alkalikus lízis módszerével tisztítottuk a DNS-t (Bender és mtsai., 1983).

A génkonverziós konstrukciókba beépített DNS-fragmentumok forrásai

Noha a BX-C-et átfogó ~300 kb hosszú DNS-szakasz klónozott formában is elérhető, mi mégis PCR módszerrel állítottuk elő a konverzióhoz szükséges homológ genomi DNS-fragmentumokat. A reakciókban templátként abból a homozigóta törzsből (*ry*⁵⁰²) származó DNS-t alkalmaztuk, amely a P-elem-beépüléseknek is háttereként szolgált. Azért tettünk így, mert a különböző forrásból származó donor és recipiens DNS-szakaszok közötti lehetséges polimorfizmus miatt a párosodás nem lett volna tökéletes (mismatch), ami a konverzió hatékonyságának csökkenéséhez vezethetett volna. A reakciókban használt egyik vagy mindkét primer az 5' végén tartalmazott egy-egy fél FRT-szekvenciát az endogén *Xba*I hasítóhellyel bezárólag. A felszaporított genomi DNS-fragmentumokat Bluescript II KS+ plazmidba klónoztuk. Az *I-Sce*I által indukált deléciók létrehozására alkalmas konverziós konstrukciókba a genomi fragmentumok közé építettünk egy ún. „fél FRT/*I-Sce*I/*Hind*III/*I-Sce*I/fél FRT kazettát”, amelyet két 76 bázispár nagyságú, egymással komplementer oligonukleotid formájában szintetizáltattunk. A markergént e kazetta *Hind*III helyére, a FLP által indukált deléciók esetén pedig a megfelelő primerbe – a két fél FRT által közrefogott genomi szekvencia és az egyik fél

FRT közé – tervezett *HindIII* helyre klónoztuk. Az ①-④ jelzésű konstrukciókban egy 7,3 kb nagyságú, *rosy*⁺ gént tartalmazó genomi *HindIII* fragmentumot használtunk markergénként. A többi konstrukció markergénje a P-elem-promóter és három kópia HSP-70 terminációs szignál által közrefogott Gal4-VP16 gén volt, amelyet egy 2,3 kb nagyságú *HindIII* fragmentum tartalmazott. A konverziós konstrukciók általános felépítése a 39. oldalon található 4. ábrán látható. A klónozási lépések további részleteit kérésre rendelkezésre bocsátjuk.

Az 6. ábrán (42. oldal) összefoglalt deléciók végpontkoordinátáit (az eltávolított bázisokat) az alábbiakban soroljuk fel. A koordináták a Seq89E számozásának felelnek meg (GenBank accession no. U31961) (Martin és mtsai., 1995).

A FLP-indukálta egyszerű, tervezett pozíciójú és méretű deléciók koordinátái és méretei:

Δ1, 219230-218962 (269 bp);	Δ2, 219626-219231 (396 bp);
Δ7, 220155-219627 (529 bp);	Δ10, 219374-219095 (280 bp);
Δ12, 219316-219190 (127 bp);	Δ13, 217765-217120 (646 bp);
Δ17, 219374-219190 (185 bp).	

A homológ kromoszómákon lévő különböző, egyszerű deléciók FLP-indukálta rekombinációjával létrehozott deléciók koordinátái és méretei:

Δ1-2, 219626-218962 (665 bp);
 Δ9-4, 219626-218962 (665 bp, tartalmazza a Gal4-VP16-ot);
 Δ7-15, 220155-218962 (1194 bp);
 Δ8-4, 220155-218962 (1194 bp, tartalmazza a Gal4-VP16-ot);
 Δ8-3, 220155-219231 (925 bp; tartalmazza a Gal4-VP16-ot);
 Δ2-19, 219626-217765 (1862 bp);
 Δ17-19, 219374-217765 (1610 bp);
 Δ4-13, 218962-217120 (1843 bp);
 Δ7-13, 220155-217120 (3036 bp).

Az I-SceI-indukálta deléciók koordinátái és méretei:

SceΔA, 219626-218944 (683 bp);	SceΔB, 219626-218897 (730 bp);
SceΔC, 219626-218939 (688 bp);	SceΔD, 219626-218762 (865 bp);
SceΔE, 219626-218755 (207 bp);	SceΔF, 219626-218686 (941 bp);
SceΔG, 220277-218212 (2066 bp);	SceΔH, 219626-218499 (1128 bp);
SceΔI, 219626-218211 (1416 bp).	

A ⑰ számú konverziós konstrukcióba a proximális FRT-n kívülre építettünk egy egyedi *SacII* hasítóhelyet. Az *iab-7* és *Mcp* PRE-kből származó genomikus fragmentumokat, valamint a H1 és H2 humán szekvenciákat PCR segítségével felszaporítottuk, majd erre a *SacII* helyre külön-külön mindegyik fragmentumot mindkét lehetséges orientációban beépítettük. Ugyanezt a *SacII* helyet használtuk fel a 185 bp-os *bxd* PRE-mag módosított változatainak klónozásához. A DSP1, PHO és GAF kötőhelyeket elrontó mutációk megegyeztek a transzgenikus kísérletekben (Déjardin és mtsai., 2005; Fritsch és mtsai., 1999; Horard és mtsai., 2000) alkalmazott kötőhely-mutációkkal. Ezeket a mutációkat tartalmazó szintetikus DNS-fragmentumokat az IDT-től (Coralville, IA) rendeltük, szekvenciájukat – a vad típus mellett – az alábbiakban tüntetjük fel.

1. Vad típus, 185 bp (219190-219374) a BX-C-ben. Kötőhelyek színek: **GAGA(G), **CCAT**, **átfedés GAGA és CCAT között**, **GATAA/G****

TAAGAGC**GAG**ATAC**GATAA**/GGACTACGCGCAC**CCATAATGG**CTGCGCCGTAAAGC**GAGAG**CGA
TCCGAGC**GAGA**AGGCTAACCGTAT**TCTCTCCCTCTCTC**CGCAGTCGCGGCGCAGTCGCTGCCTCT
GCAGCTCCGTCG**CCATA**ACTGTCGTTTCGTA**ATGG**CCGTTTTAAGTGCGACT**GAGATGGC**

2. GAGA* szintetikus oligonukleotid. Kötőhelyek színek: az 1. pont szerint, kivéve elrontott **GAGA**

TAAGAGC**GCT**ATAC**GATAA**AGACTACGCGCAC**CCATAATGG**CTGCGCCGTAAAGC**GCTAG**CGATC
CGAGC**GCTA**AGGCTAACCGTAT**TCTGGCCCTATTTCC**CGCAGTCGCGGCGCAGTCGCTGCCTCTGC
AGCTCCGTCG**CCATA**ACTGTCGTTTCGTA**ATGG**CCGTTTTAAGTGCGACT**GCTATGGC**

2. PHO* szintetikus oligonukleotid. Kötőhelyek színek: az 1. pont szerint, kivéve elrontott **CCAT**

TAAGAGC**GAG**ATAC**GATAA**AGACTACGCGCAC**TGTAA****CAG**CTGCGCCGTAAAGC**GAGAG**CGATC
CGAGC**GAGA**AGGCTAACCGTAT**TCTCTCCCTCTCTC**CGCAGTCGCGGCGCAGTCGCTGCCTCTGC
AGCTCCGTCG**TGTAA**ACTGTCGTTTCGTA**CAG**CCGTTTTAAGTGCGACT**GAGACAGC**

3. GAGA*+PHO* szintetikus oligonukleotid. Kötőhelyek színek: az 1. pont szerint, kivéve elrontott **GAGA, elrontott **CCAT****

TAAGAGC**GCT**ATAC**GATAA**AGACTACGCGCAC**TGTAA****CAG**CTGCGCCGTAAAGC**GCTAG**CGATC
CGAGC**GCTA**AGGCTAACCGTAT**TCTGGCCCTATTTCC**CGCAGTCGCGGCGCAGTCGCTGCCTCTGC
AGCTCCGTCG**TGTAA**ACTGTCGTTTCGTA**CAG**CCGTTTTAAGTGCGACT**GCTACAGC**

4. GAGA*+DSP1* szintetikus oligonukleotid. Kötőhelyek színek: az 1. pont szerint, kivéve elrontott **GAGA, elrontott **GATAA****

TAAGAGCGCTATACAGACGCGACTACGCGCACCATTAATGGCTGCGCCGTAAAGCGCTAGCGATC
 CGAGCGCTAAGGCTAACCGTATCTGGCCCTATTTCGCGAGTCGCGGCGCAGTCGCTGCCTCTGC
 AGCTCCGTCGCCATAACTGTCGTTTCGTAATGGCCGTTTTAAGTGCGACTGCTATGGC

5. PHO*+DSP1* szintetikus oligonukleotid. Kötőhelyek színekódja: az 1. pont szerint,
 kivéve elrontott CCAT, elrontott GATAA

TAAGAGCGAGATACAGACGCGACTACGCGCACGTAAACAGCTGCGCCGTAAAGCGAGAGCGATC
 CGAGCGAGAAAGGCTAACCGTATCTCTCCCTCTCTCCGCGAGTCGCGGCGCAGTCGCTGCCTCTGC
 AGCTCCGTCGCTGTAACCTGTCGTTTCGTAACAGCCGTTTTAAGTGCGACTGAGACAGC

A génkonverziós kísérletek leírása

A génkonverzió végbemenetelének alapfeltétele egy duplaszálú DNS-törés indukálása a konvertálni kívánt régió közelében (4. ábra, 39. oldal). Ehhez olyan törzseket használtunk, amelyek hordozták a JE24, a HF79 vagy a HC109A ry^- P elemek (Bender és Hudson, 2000) egyikét. Az ①, ③ és ④ jelzésű konstrukciók konverziójához ry JE24/MKRS genotípusú legyeket kereszteztünk ry pbx^2 /MKRS genotípusú legyekhez. Az utód embriókba együtt injektáltuk a megfelelő konstrukciót (1 μ g/ μ l) és a transzpozázt kódoló (helper) Δ 2-3 plazmidot (250 ng/ μ l). Az injektált embriókból fejlődő ry JE24/ ry pbx^2 felnőtteket pártenyészetekben cn^1 ; ry^{502} Fab-7 legyekhez kereszteztük. A ry^+ konvertáns utódokból törzset alapítottunk MKRS vagy TM2 ry^{2101} balanszer kromoszómák segítségével. A konverziós eseményeket egész genomon végzett Southern blotting technikával ellenőriztük. A ② jelű konverziós konstrukció esetén a ry JE24/MKRS törzs helyett homozigóta ry HF79 genotípusú legyeket használtunk. Az ⑤ és ⑥ jelű konstrukciók esetén pedig a ry JE24/MKRS törzset ry pbx^2 , Δ 2-3 99B/TM3 ry , Δ 2-3 99B genotípusú legyekkel kereszteztük, majd a fejlődő embriókba csak a konverziós konstrukciót injektáltuk. A kikelő felnőtt ry JE24/ ry pbx^2 Δ 2-3 99B legyeket tömegtenyészetben olyan törzshöz kereszteztük, amely a második kromoszómáján homozigóta formában hordozta a P{UAS-eGFP} transzgént. Az ebből a keresztezésből származó embriókat szénnel feketére színezett almalé-tartalmú táptalajon gyűjtöttük össze, majd a kifejeződő GFP-nek köszönhetően fluoreszkáló kikelő lárvákat MZ FLIII sztereomikroszkóp (Leica, Heerbrugg, Switzerland) segítségével kiválogattuk. Az epidermiszben és az idegrendszerben szelvényt specifikus módon korlátozott GFP kifejeződési mintázatot mutató lárvákat használtuk fel egyenként a

törzsalapításokhoz. A konverziós eseményeket PCR technikával ellenőriztük. A ⑦-⑨ számú konstrukciók injektálására olyan embriókat használtunk, amelyek a $ry\ pbx^2\ \Delta 2-3\ 99B$ kromoszómát heterozigóta formában hordozták egy ry^- deléciós kromoszómával szemben. Ez utóbbi deléciót a HF79 és HC109A P elemek FRT helyei közötti rekombinációval hoztuk létre. Az összes többi konstrukció konverziójához homozigóta $ry\ JE24\ Fab-7$ hímeket kereszteztünk $ry\ pbx^2\ \Delta 2-3/TM3\ ry, \Delta 2-3\ 99B$ nőtényekhez.

Deléció létrehozása a konverziós kromoszómán FLP rekombináz segítségével

Az ① és ② számú (ry^+ génnel markerelt) konvertáns hímeket homozigóta $y^l\ w^{1118}, P\{ry^+, hsflp\}; ry^{502}\ Fab-7$ nőtényekhez kereszteztük (4. ábra I. stratégia, 39. oldal). Az utódokat első stádiumos lárvák korukban hősokkoltuk (1 h, 37°C). A kikelő hímeket $MKRS/TM2\ ry^{2101}$ nőtényekhez kereszteztük, a hím utódok közül pedig kiválasztottuk a potenciálisan deléciót hordozó ry^- , nem $Fab-7$ egyedeket, melyekből törzseket alapítottunk. A deléciókat PCR-rel ellenőriztük, valamint a PCR-termékeket időnként szekvenáltattuk, hogy megbizonyosodjunk róla: a deléciók tervezett végpontjai megfelelnek a valóságos végpontoknak. A ⑦ számú konvertáns hímeket (a Gal4-VP16 génnel markerelve) a fentiekhez hasonló genotípusú nőtényekkel kereszteztük. A hősokkolt hím utódokat $w^{1118}, P\{UAS-eGFP\}; MKRS/TM2\ ry^{2101}$ nőtényekhez kereszteztük, majd a nem fluoreszkáló, nem $Fab-7$ hím utódokról feltételeztük, hogy hordozzák a kívánt deléciót. A ⑩, ⑫, ⑬ és ⑰ jelű konvertáns hímeket $y^l\ w^{1118}, P\{ry^+, hsflp\}; ry^{502}$ nőtényekhez kereszteztük. Ebben az esetben a nem fluoreszkáló $Fab-7$ hím utódok hordozták a megfelelő deléciót.

Deléció/duplikáció létrehozása két konverziós kromoszóma közötti rekombinációval FLP rekombináz segítségével

Két különböző konverziós kromoszómán, transz helyzetben lévő egy-egy FRT szekvencia (FRT1 és FRT2) közötti rekombinációval deléciókat ill. duplikációkat hoztunk létre (5. ábra, 40. oldal). Széli markereket helyeztünk el mindkét konverziós kromoszómán, ezek tették lehetővé a rekombinánsok azonosítását. Az általános séma szerint $y^l\ C(1)/Y; FRT2\ Dr^l/TM6B, Sb, Tb$ nőtényeket kereszteztünk $y^l\ w^{1118}, P\{ry^+, hsflp\}; ry^{502}/Ki^l$ FRT1 hímekhez.

Az utódokat első stádiumos lárva korban hősokkoltuk, majd a kikelő $y^l w^{1118}$, $P\{ry^+, hsf1p\}; Kt^l$ FRT1/FRT2 Dr^l hímeket $cn^l; ry^{502}$ vagy $cn^l; ry^{502}$ *Fab-7* nőstényekhez kereszteztük. A rekombináció irányának megfelelően a széli markerek jelenlétére vagy hiányára szelektáltunk az utódok között attól függően, hogy deléciókat vagy duplikációkat akartunk létrehozni. A rekombinánsokat PCR-rel ellenőriztük.

Deléció létrehozása a konverziós/deléciós kromoszómán I-SceI endonukleáz segítségével

A módszer elvi sémáját a 4. ábrán (II. stratégia, 39. oldal) mutatjuk be. Egy egyszerű „FRT/I-SceI/ *HindIII*/I-SceI/FRT kazettát” hordozó kromoszóma helyett a módszer kipróbálásához valójában egy meglévő delécióval ($\Delta 1-2$) kapcsoltunk össze egy „FRT/I-SceI/*HindIII*/I-SceI/FRT kazettát” (④) tartalmazó kromoszómát. Az eredményül kapott kromoszómát $\Delta 1-2$, *Sce ry⁺*-nak neveztük. Ezt követően I-SceI endonukleázzal hasítottuk a kromoszómát a következő séma szerint. $\Delta 1-2$, *Sce ry⁺/MKRS* nőstényeket kereszteztünk ry^+ , *DfUbx¹⁰⁹*, *β -tub I-SceI/MKRS* hímeikkel. Az utód $\Delta 1-2$, *Sce ry⁺/ry⁺*, *DfUbx¹⁰⁹*, *β -tub I-SceI* genotípusú hímeket ry^- , *Fab-7* homozigóta nőstényekkel kereszteztük. A kikelő $\Delta 1-2$, *Sce* ry⁻/ ry⁻*, *Fab-7* állatok hordoztak potenciálisan megnövekedett deléciót. Az ilyen genotípusú legyekből törzset alapítottunk, majd a deléciók kiterjedését PCR technikával és szekvenálással határoztuk meg.

A legyek fenotípusának kiértékelése

A deléciók által okozott mutáns fenotípus-alosztályokat a $\Delta 1-2$ példáján keresztül a 3. táblázatban (46. oldal) foglaltuk össze. Az egyes fenotípus-jegyeket a heterozigóta konvertánsok F1 generációiban, konvertánsenként két párhuzamos vonalban vizsgáltuk. Transzformálnak tekintettük azt az egyedet, amely a 3. táblázatban (46. oldal) szereplő mutáns fenotípusok közül mutatott legalább egyet. A fenotípus-analízishez – az egyes törzsek fenntartása során bekövetkező penetrancia- és expresszivitás-csökkenés hatásainak kivédése érdekében – a deléciókat mindig „frissen” állítottuk elő.

Immunfestés embriókon és lárvákon

Vad típusú és a $\Delta 1-2$ ill. $\Delta 7-13$ jelű deléciókra homozigóta embriókat gyűjtöttünk kb. 17 óras 25°C-on történő petéztetést követően. A különböző genotípusú embriókat párhuzamosan

kezeltük a korábban leírtak (Sipos és mtsai., 1998) szerint. Az UBX elleni elsődleges ellenanyagot Robert White-től (Cambridge University, Cambridge, Egyesült Királyság) kaptuk. Az embriókat PBS-ben (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Na-foszfát, pH 7,0) mélyített tárgylemezen fotóztuk.

A $\Delta 1-2$ ill. $\Delta 7-13$ jelű deléciókra homozigóta és a *Bc* lárvális markert hordozó, vad típusú harmadik stádiumos vándorló lárvákat 25°C-on összegyűjtöttük, desztillált vízben megmostuk, majd 4°C-os PBS-ben félbevágtuk. A lárvák elülső részét csipesszel kifordítottuk, ezt követően az imágókorongokon és az agyon kívül minden egyéb szövetet eltávolítottunk az epidermiszről. Négy fél lárvát (kettő vad típusút és kettő homozigóta delécióst) festettünk ugyanabban a centrifugacsőben az embriók immunfestési protokollja szerint (Sipos és mtsai., 1998).

A lárvális kutikula előkészítése és fényképezése

A lárvákat étterrel túlaltattuk, majd 1X PBS-ben addig forraltuk, amíg izmai elernyedtek. A fotózáshoz üveg tárgylemezre helyeztük őket, befedtük immerziós olajjal, majd fedőlemezt helyeztünk rá, amelyet kissé rányomtunk a tárgylemezre, hogy a felforralt lárvák megfelelően szétlapuljanak. A fotókat M420 Macroscop-hoz (Wild Heerbrugg, Heerbrugg, Switzerland) csatlakoztatott KP-C550 CCD-kamerával (Hitachi, Tokyo) vagy Leica MZ FLIII sztereomikroszkóphoz csatlakoztatott Leica DC300F digitális kamerával készítettük. A kontraszt- és fényerőbeállításokat a Photoshop 7.0 programmal végeztük (Adobe Systems, San Jose, CA).

Homológiakeresés BLAST-tal

A 185 bp-os *Drosophila bxd* PRE-maggal végeztünk homológiakeresést minden ismert emlős szekvencia között az NCBI weboldalán (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) található programmal. Ehhez a jelenleg elérhető szoftver egy régebbi verzióját, a BLASTN 2.2.12 [2005. aug. 7.]-t (Altschul és mtsai., 1997) használtuk. A BLAST homológia-keresés eredménye:

Query= *Drosophila melanogaster bxd* PRE-mag (185 betű)

Szignifikáns megfelelést mutató szekvenciák:

	Score (Bits)	E Value
gi 56369807 emb CR759947.5 Gorilla DNA sequence from clone CH25	40.1	1.2

[gi|27777572|gb|AC008746.10|](#) Homo sapiens chromosome 19 clone CTD [40.1](#) 1.2
[gi|31376406|gb|AC105600.5|](#) Rattus norvegicus 4 BAC CH230-209E... [38.2](#) 4.9

A homológ szekvenciák illeszkedése:

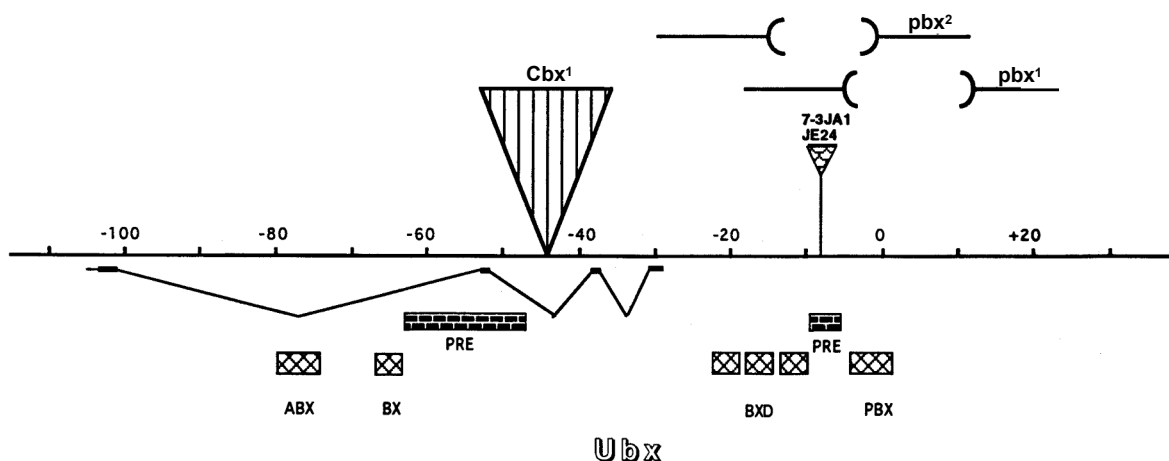
Drosophila m.	86	TCTCTCCCTCTCTCCGCAGT	105
Gorilla g.	7864	TCTCTCCCTCTCTCCGCAGT	7883
 Drosophila m.	 86	 TCTCTCCCTCTCTCCGCAGT	 105
Homo s.	111007	TCTCTCCCTCTCTCCGCAGT	111026
 Drosophila m.	 84	 TATCTCTCCCTCTCTCCGC	 102
Rattus n.	132682	TATCTCTCCCTCTCTCCGC	132700

EREDMÉNYEK

A P-elem közvetítette génkonverzió módszerének továbbfejlesztése

A duplaszálú DNS-törés előfeltétele a genom helyspecifikus módosításának. A P-elem közvetítette génkonverzió az egyik olyan *Drosophila*-ban alkalmazott módszer, amely segítségével – a duplaszálú törés által aktivált endogén hibajavító rendszert kihasználva – helyspecifikus módon donor szekvenciákat tudunk a törés környezetébe beépíteni. A vizsgálni kívánt *bx*d PRE régióban külföldi együttműködő partnerünk, Prof. Welcome Bender (Harvard Medical School, Boston) számos P-elem-beépülést azonosított (Bender és Hudson, 2000), ezek mobilizációjával indukáltuk a génkonverzió folyamatát.

A *bx*d PRE az általa szabályozott *Ubx* transzkripció indulási helyétől 5' irányban helyezkedik el mintegy 25 kb-nyira (3. ábra). Habár végcélunk a *bx*d PRE-t tartalmazó 3 kb



3. ábra Az *Ubx* gén transzkripció egysége és szabályozó-régiói (*abx/bx*, *bx*d/*pbx*). A térképpozíciókat Bender és mtsai. (1983) nyomán tüntettük fel (mértékegység: kb). Az enhanszereket rácsozott téglalapok jelölik. A *pbx*¹ deléció által eltávolított szakasz az *abx/bx* szabályozó-régióba helyeződött át (*Cbx*¹). A *pbx*¹ (17 kb) és a *pbx*² (15 kb) deléció felnőtt állatokban azonos fenotípust okoz: a billér hátsó része szárnyrá módosul a homozigótákban. A *pbx*² deléciót használtuk átfedő delécióként a konverziós kísérletekben. A *pbx*² a *bx*d PRE-n kívül enhanszereket is eltávolít a *bx*d/*pbx* szabályozó régióból.

méretű DNS-szakasz *in situ* deléciós analízise volt, a korábban alkalmazott génkonverziós technikákkal ellentétben mi mégsem a létrehozandó deléciókat építettük a donor konstrukciókba. Ennek egyik oka az volt, hogy a beépült deléciók az *Ubx* gén kifejeződését elvileg letális módon

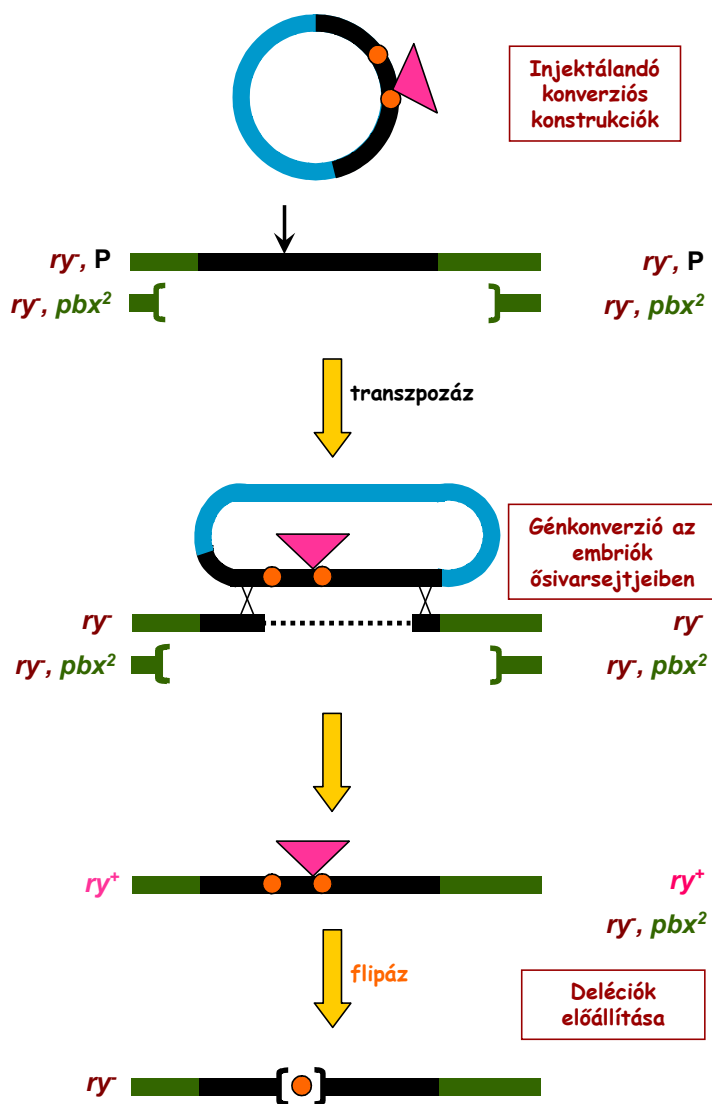
is megváltoztathatták volna, ezzel lehetetlenné téve a felnőtt konvertáns legyek létrehozását. Első lépésként FRT (flipase recognition target) helyek közé építettük az eltávolítandó DNS-fragmentumot és egy markergént (*rosy*⁺ vagy *Gal4-VP16*) (4. ábra I. stratégia). A hibajavító rendszer számára a felismerendő homológ DNS-szakaszokat az FRT helyeken kívül helyeztük el. Az ilyen módon elkészített donor konstrukciók „vad típusú” *bx*d PRE-szakaszait, a közbeékelte markergénnel és FRT-szekvenciákkal együtt P-elem közvetítette génkonverzióval beépítettük a *bx*d PRE homológ régióiba. A konvertálandó kromoszómával szemben a *bx*d PRE-t átfedő, nagyméretű deléciót (*pbx*²) (3. ábra) alkalmaztunk annak biztosítására, hogy a hibajavító rendszer számára az egyetlen felhasználható templát a konverziós konstrukció legyen (4. ábra). A deléciókat csak ezt követően hoztuk létre úgy, hogy az élesztő flipáz enzimét kifejeztettük a konvertáns legyekben. Az általunk továbbfejlesztett módszer további előnye, hogy a konverziót a konstrukcióba épített markergén kifejeződésével, a deléció létrejöttét pedig ugyanannak a markergénnek az elvesztésével követni tudtuk. Ezzel szemben, a korábban alkalmazott génkonverziós technikák esetén a markergénnel csak a kezdő lépést, a P-elem kiugrását lehetett ellenőrizni, amit szükségszerűen a markergénmentes egyedek kiterjedt molekuláris szűrése követett.

A technika további apró finomításával a *bx*d PRE kisebb szakaszait helyettesíteni tudtuk más, hasonló méretű, tetszőleges DNS-fragmentumokkal. Az I. stratégiától ez a módszer annyiban különbözik, hogy a konverziós konstrukcióba a proximális FRT-n kívülre PCR-rel bevittünk egy egyedi restrikciós hasítóhelyet, erre a helyre építettük be az „idegen” szakaszt. Ily módon tehát a *bx*d PRE általunk meghatározott részében tetszőlegesen módosíthattuk az ott található PcG-kötőhelyeket vagy az adott szakaszt kicserélhettük például más ismert PRE-kra.

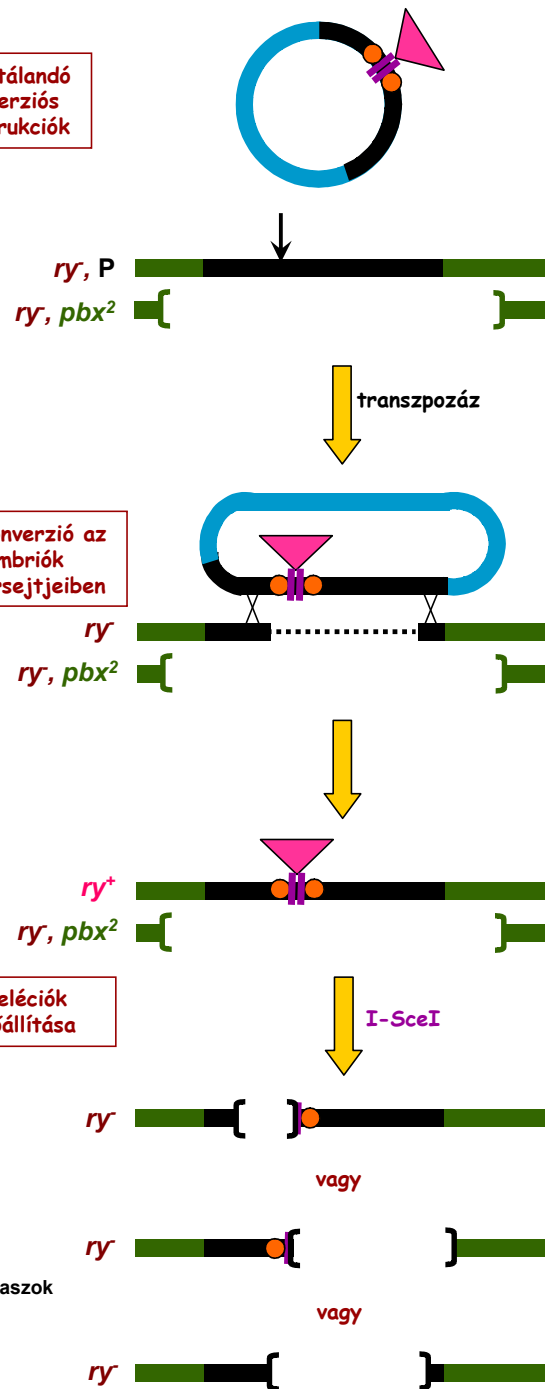
Egy másik megközelítésben olyan konverziós konstrukciókat készítettünk, amelyek a markergén mellett tartalmazták a ritkán hasító *I-SceI* enzim felismerőhelyét is. A konvertáns legyekben *I-SceI* enzimet termeltetve duplaszálú DNS-töréseket indukáltunk, amelyekből kiindulva az exonukleázok és a töréseket javító rendszer működésének eredményeképpen random méretű deléciók keletkeztek (4. ábra II. stratégia).

A flipáz által indukált deléciók mellett a kromoszómában maradt egy-egy FRT hely, amely új eszközként szolgált arra, hogy bármely két életképes deléció között rekombinációt indukáljunk, és ezáltal összekapcsoljuk az egyes deléciókat vagy létrehozzuk az FRT-k közötti

I. STRATÉGIA



II. STRATÉGIA

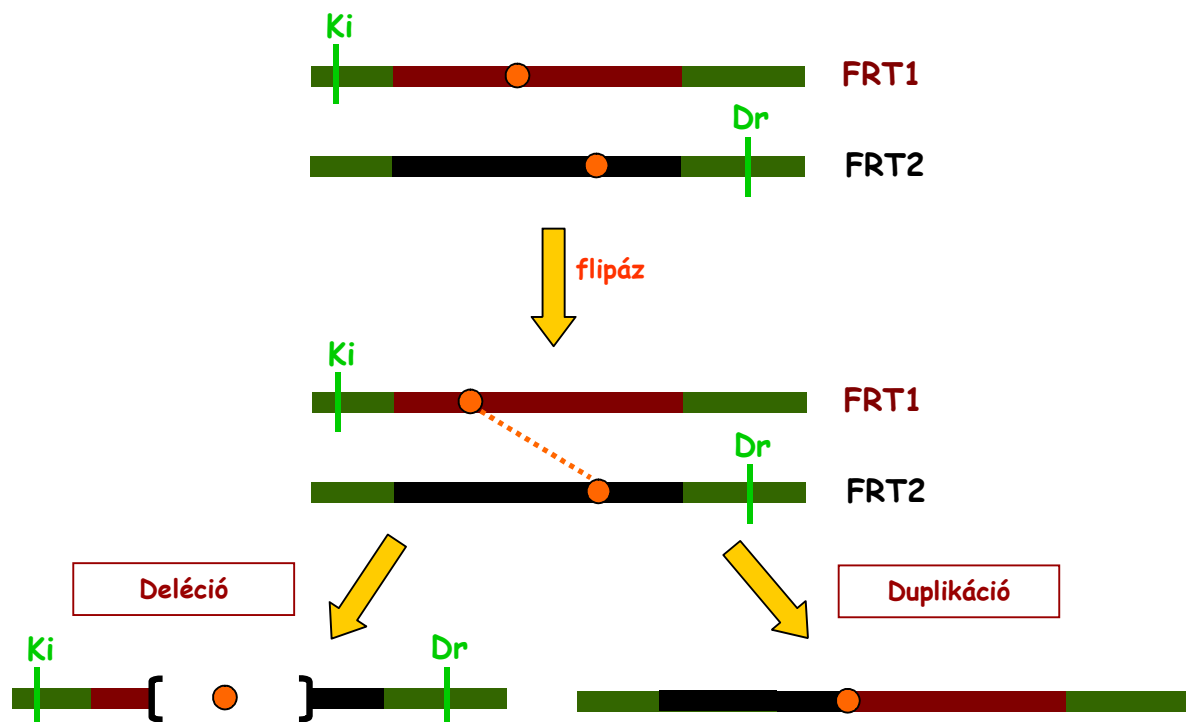


Jelmagyarázat:

- a konstrukció és a kromoszóma közötti homológ szakaszok
- Bluescript plazmid
- ▼ *ry*⁺ markergén
- FRT rekombinációs hely
- | I-SceI hasítóhely
- [] deléció

4. ábra A továbbfejlesztett P-elem közvetítette génkonverziós stratégiák vázlata. A génkonverziós konstrukciókat olyan $r\gamma^-$ embriókba injektáljuk, amelyek egy P-elem-beépüléssel rendelkeztek a módosítandó régió közelében. A P-elem mobilizációjával előállított kettősszalú töréstől kiindulva a kromoszóma szabad végei leemésztnődnek. A folyamat aktiválja a DNS-hibajavító rendszert, amely a homológ kromoszómán található átfedő deléció miatt a donor konstrukciót használja templátként a lézió „befoltozására”. A sikeres konverziót a vad szemszín megjelenése jelzi az utódok körében. Az I. stratégia esetében a deléciót az FRT-szekvenciák közötti rekombináció segítségével hozzuk létre, a II. stratégia esetében pedig kettősszalú törést indukálunk az *I-SceI*-hasítóhelyeknél. A deléciós állatok *rosy* szemszínűek. Az ábrán csak a technika megértése szempontjából elsőrendű fontosságú kromoszómákat tüntettük fel.

DELÉCIO/DUPLIKÁCIO KÉSZÍTÉSE ÚJABB GÉN KONVERZIÓ NÉLKÜL



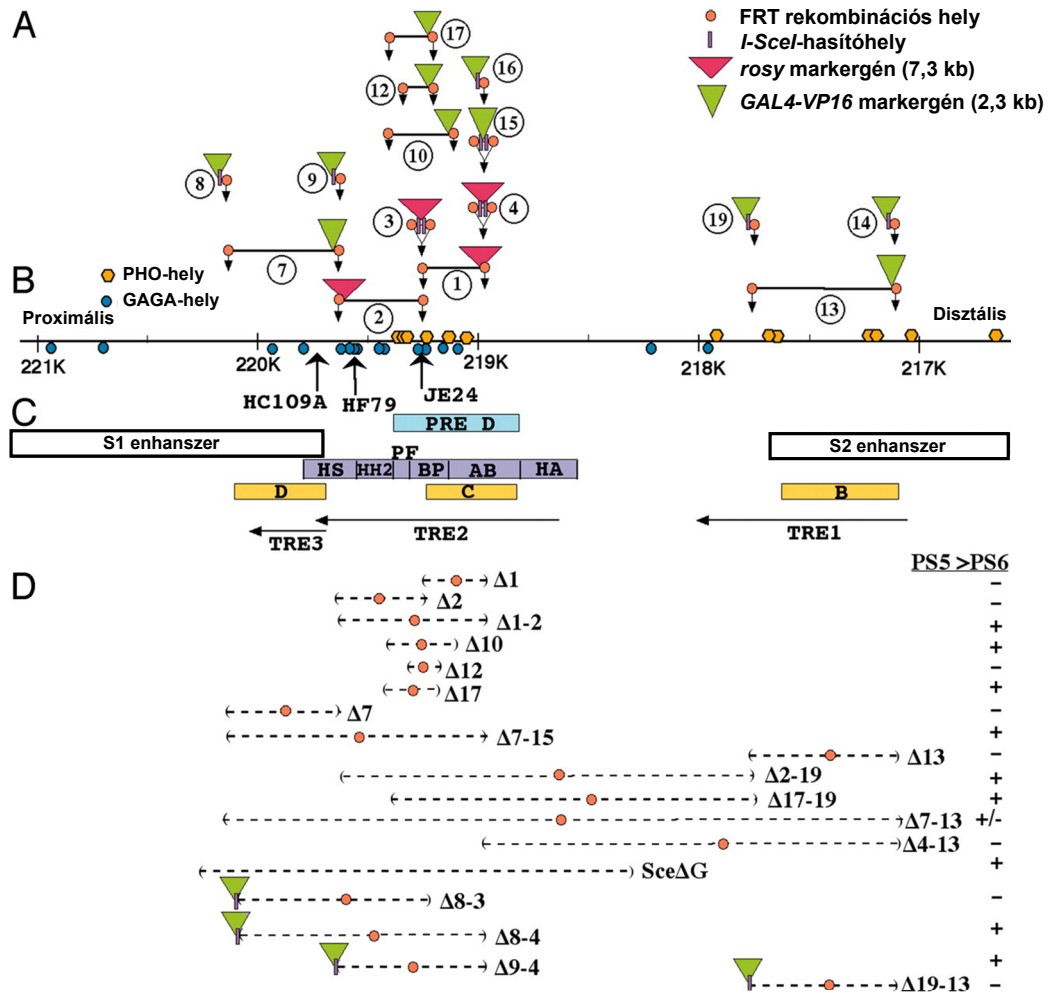
5. ábra A konvertáns kromoszómák felhasználása további deléciók és duplikációk létrehozására. Az ábrán egyszerűsített módon mutatjuk be, a kromoszómákban maradó FRT-szekvenciák közötti rekombináció segítségével hogyan indukálhatók deléciók és duplikációk. A módszer előnye, hogy nem szükséges újabb génkonverziós konstrukciók készítése és beépítése a végrehajtásához, ezáltal rövid idő alatt nagyszámú további deléciót és duplikációt tudunk létrehozni. A technika alkalmas inszerció-inszerció, inszerció-deléció és deléció-deléció „összekapcsolására” is. A rekombinációs eseményeket a széli domináns markerek együttes megjelenésével illetve hiányával követjük. Csak a módszer megértése szempontjából elsőrendű fontosságú kromoszómákat tüntettük fel.

szakaszok tandem duplikációját. Ilyen típusú rekombinációkat deléció-inszerció és inszerció-inszerció (5. ábra) között is létre tudtunk hozni.

Ezenkívül speciálisan tervezett konstrukciók segítségével létrehozott konvertáns (lsd. ⑧ és ⑨, 6. ábra A) és deléciós kromoszómákon lévő FRT szekvenciák közötti rekombinációval lehetséges volt a *Gal4-VP16* markergén megtartása is az egyes deléciók mellett. Az UAS-eGFP rendszer segítségével az ilyen állatokban követni tudtuk a *Gal4-VP16* kifejeződési mintázatát, amely a PRE és a helyi enhanszerek aktivitását tükrözte. Az így nyert információkból következtetni tudtunk a *bx*d PRE működési mechanizmusára.

Összesen 33 db génkonverziós konstrukciót építettünk be a HC109A, a HF79 vagy a JE24 P-elem (6. ábra B) mobilizálásával a 3. kromoszómán található *bx*d régióba. Ezek közül 15 beépült konstrukciót tüntettünk fel az 6A. ábrán. Az ábrán nem szereplő konstrukciókat a *bx*d PRE általunk meghatározott részének mutáltatására vagy más PRE-kra történő kicserélésére, illetve a lokális kromatinszerkezet szondázására használtuk fel. Az ①-④ konstrukciók (*rosy*⁺ markergén) esetében teljes genomon végzett Southern blotting technikával ellenőriztük, hogy a konverziós események a tervezettnél megfelelően következtek-e be. A többi konstrukcióban a rövidebb *Gal4-VP16* markergént használtuk, amely a környező szakaszokkal együtt könnyen amplifikálható volt PCR módszerrel, ezért ezzel a technikával ellenőriztük a donor szakasz megfelelő beépülését. Az egyes deléciók létrejöttét a markergén elvesztésével követtük, pontos koordinátáikat alkalmasszerűen, a megfelelő fragmentum PCR technikával történő amplifikálását követően szekvenálással igazoltuk.

Az egyes deléciók esetén tapasztalt – későbbiekben ismertetendő – fenotípusokat nem okozhatták a P-elem mobilizációjából származó másodlagos mutációk (másodlagos P-elem-beépülések vagy a *bx*d PRE-ban maradó hiányos P-elem-szekvenciák). Ezt a következő módszerekkel biztosítottuk. Azok az egyedek, amelyekben a P-elem ugrását követően megtörtént a donor szekvencia beépülése (konvertánsok), vad típusúak voltak, tehát egy esetleges másodlagos P-elem-beépülés ezekben az állatokban nem okozott domináns fenotípust. Ezután a konvertáns egyedekből törzseket alapítottunk, melynek során ügyeltünk arra, hogy a transzpozázforrást kiiktassuk a rendszerből. Így megakadályoztuk a további P-elem-mobilizációkat, amelyek ismét másodlagos mutációkat okozhattak volna. Az egyes tervezett



6. ábra A *bxd* PRE-régió és a létrehozott deléciók térképe. (A) 15 konverziós konstrukció releváns részeit tüntettük fel, a függőleges nyilak a beépülés pozícióját mutatják. (B) A fekete vonal 4,5 kb hosszú DNS-t jelöl. A koordinátákat a Seq89E (Martin és mtsai., 1995) szerint adtuk meg. A Pleiohomeiotic fehérje kötőhelyeit (GCCAT) narancssárga, a GAGA-helyeket (GAGAG) pedig kék körökkel jelöltük. A felfelé mutató függőleges nyilak a génkonverzióhoz használt P-elemeket mutatják. (C) A fehér téglalapok a 2 embrionális enhanszert, a világoskék és lila téglalapok pedig a transzgenikus kísérletek alapján PRE-aktivitással rendelkező alfragmentumokat (Fritsch és mtsai., 1999 ; Horard és mtsai., 2000) jelölik. A sárga téglalapok a 3 PRE/TRE helyzetét mutatják egy másik, immunoprecipitációra és transzgenikus tesztekre épülő kísérlet eredményei alapján (Tillib és mtsai., 1999). A TRE1, TRE2 és TRE3 jelű nyilakkal azokat a kisméretű RNS-transzkriptumokat tüntettük fel, amelyekről kimutatták, hogy magukhoz vonzzák az *Ubx* aktivátorait (Sanchez-Elsner és mtsai., 2006). (D) A szaggatott vonalak a deléciók kiterjedését jelölik a térképen. Majdnem minden deléció pozíciójában visszamarad egy FRT-hely, amelyet narancssárga kör jelez. Az alsó 4 deléció mellett egy-egy *Gal4-VP16* markergén és egy-egy *I-SceI*-hasítóhelyet is a kromoszómában „hagytunk”. A

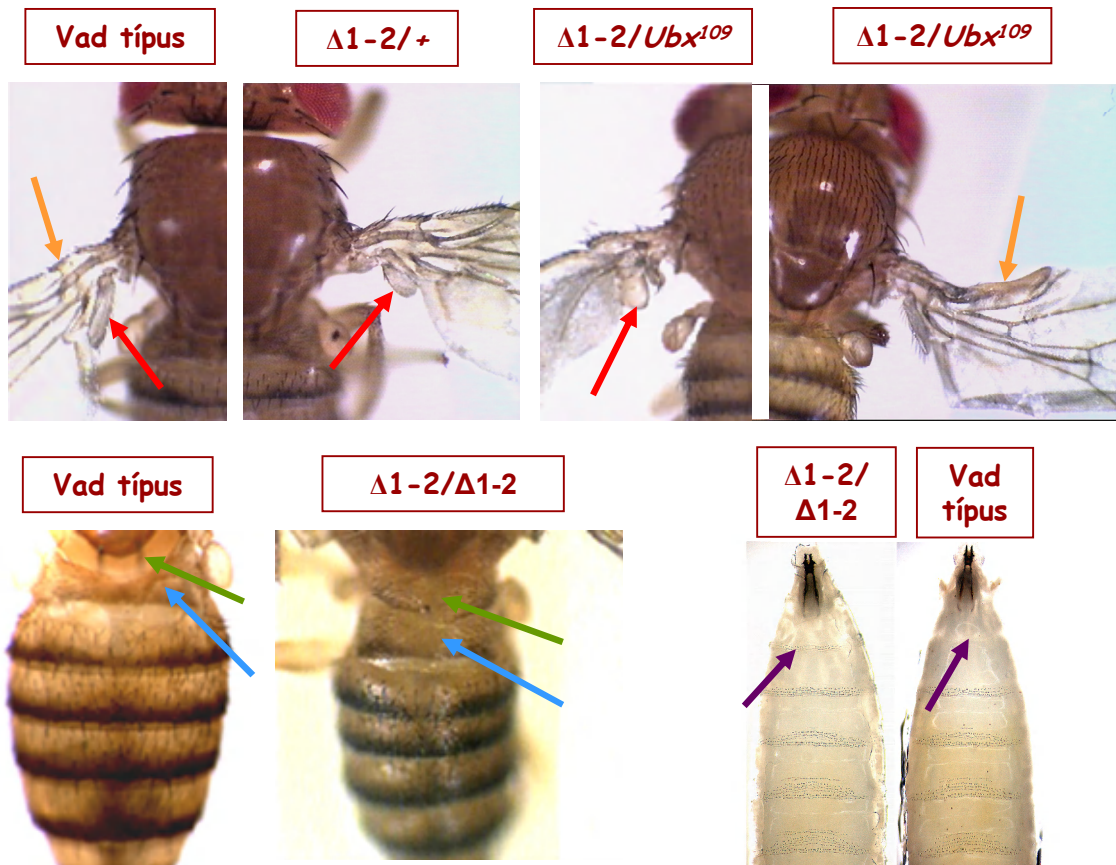
poszterior transzformációs fenotípus jelenlétét (+) vagy hiányát (-) minden deléció esetén az ábra jobb oldalán tüntettük fel.

deléciókat újabb keresztezési lépéssel hoztuk létre, melynek eredményeképpen bizonyos deléciók esetén továbbra sem kaptunk domináns fenotípust, míg más deléciók esetén domináns fenotípust tapasztaltunk. Tehát a P-elem ugrásától több generációnyi keresztezéssel jutottunk el a kívánt deléció létrehozásáig, és domináns fenotípus csak bizonyos deléciók indukálását követően jelent meg. E keresztezések során egy esetleges, 3. kromoszómától különböző kromoszómára történt másodlagos P-elem-beépülés nagy valószínűséggel szegregálódott a konvertáns illetve a deléciós kromoszómától. A konverziós és deléciós események ellenőrzésére alkalmazott PCR kísérletekből megállapítottuk továbbá, hogy a P-elem nem épült vissza a *bxd* PRE-ba, illetve nem maradtak benne hiányos P-elem-szekvenciák, így ott másodlagos mutációkat sem hozhattak létre. Egy-egy deléció esetében a 3. kromoszóma *bxd* PRE-n kívüli szakaszaiba esetlegesen beépült P-elem sem lehet felelős a tapasztalt fenotípusokért, hiszen több független konverziós eseményből származó deléció is ugyanazt a mutáns fenotípust eredményezte. Számos esetben FRT-szekvenciák közötti rekombináció segítségével lecseréltük a 3. kromoszóma proximális illetve disztális részét, ezáltal „megszabadultunk” az ezen genomrégiókba épült esetleges, domináns fenotípust nem okozó P-elem-beépülésektől is.

Az első deléciók létrehozása a központi PRE-régióban

Az első konverziós konstrukciókkal a *bxd* PRE azon részeit céloztuk meg, amelyek a legnagyobb PRE-aktivitást mutatták az egyik transzgenikus kísérletben (Horard és mtsai., 2000) és a legerősebben kapcsolódtak a PC fehérjéhez keresztkötési tesztekben (Kahn és mtsai., 2006). Ebben a régióban halmozottan találjuk a Pleiohomeotic (PHO) fehérje kötőhelyeit és a GAGA-kötőhelyeket (6. ábra B). Ez utóbbihoz mind a GAGA, mind a PSQ fehérje képes kapcsolódni. Az első két konverziós konstrukció (① és ② a 6A. ábrán) segítségével egy 269 bp ($\Delta 1$) és egy 396 bp ($\Delta 2$) méretű deléciót (6. ábra D) hoztunk létre. Ezek a deléciók homozigóta, heterozigóta (vad kromoszómával szemben), és „hemizigóta” (nagyobb, átfedő delécióval szemben) formában sem okoztak észrevehető fenotipikus változást a felnőtt legyeken (6. ábra D). Ezzel szemben, amikor ezt a két deléciót flipáz indukálta rekombinációval összekapcsoltuk ($\Delta 1-2$, 665 bp; 6. ábra D), drámai poszterior irányú szelvénytranszformációk jelentek meg az állatokon. A

$\Delta 1-2$ -re heterozigóta legyek szárnyának hátsó része gyakran – a *Contrabithorax* mutációkra emlékeztető módon – részlegesen billérré transzformálódott (7. ábra). Néha az anterior szárnyél is billérszövetté alakult (7. ábra). Ritkán az első potroh tergitje pigmentált volt, és még ritkábban a hátsó szélén nagy szőrök nőttek; ezek a tulajdonságok az első potrohszelvény második potrohszelvénné ($A1 \rightarrow A2$) történő részleges transzformációját jelzik, hiszen normálisan a



7. ábra A *bxd* PRE-deléciók fenotípusai. Az ábra jobb alsó sarkában festetlen lárvális kutikulákat tüntettünk fel, a többi fotó felnőtt legyekről készült. Minden fénykép felett az adott állat genotípusa látható. A funkcionyeréses fenotípus szempontjából releváns szelvényeket/képleteket a könnyű összehasonlíthatóság érdekében azonos színű nyilakkal jelöltük a vad és a deléciós állatokon. A felnőtt $\Delta 1-2$ „hemizigóta” legyeken mutatjuk be a szárny elülső részének billérszövetté történő transzformációját (narancssárga nyíl). A $\Delta 1-2$ heterozigóta és „hemizigóta” állatokon figyelhetjük meg a szárny hátsó részének billérré alakulását (piros nyíl). 1. potrohszelvénné (kék nyíl) transzformálódott a 3. torsi-szelvény az itt bemutatott $\Delta 1-2$ homozigóta legyen (zöld nyíl). A vad típusú lárva 3. torsi-szelvényén található horogsorok átlátszóak, míg a $\Delta 1-2$ homozigóta lárva ezen képletei az abdominális horogsorokhoz hasonlóan sötét színűek (lila nyíl).

második potrohszelvényre jellemzőek. Az A1→A2 transzformációkat valószínűleg az ABD-A vadtól eltérő, ektopikus kifejeződése (derepressziója) okozta az érintett sejtekben (nem vizsgáltuk), viszont a jelenséggel nem járt együtt az ennek megfelelő csökkenés az UBX kifejeződési szintjében (8. ábra, 47. oldal). A tor és a potroh közötti területen időnként apró szőrökkel borított idegen szövetet figyeltünk meg, melynek eredete a homozigóta állatok vizsgálatakor vált egyértelművé. Ezek a legyek olyan fenotípust mutattak, amelyet eddig nem írtak le a bithorax komplex mutációi között: a harmadik torsiálszelvény változó mértékű – néha teljes – első potrohszelvénné történő transzformációját (7. ábra). Általában véve a heterozigótákban megfigyelt transzformációkat homozigótákban súlyosabbnak és gyakoribbnak találtuk. A transzformációs fenotípusok penetranciája az $\Delta 1-2$ homozigótákban megközelítette a 100%-ot és számos generáción át stabil maradt. Érdekes módon, ha az $\Delta 1-2$ kromoszómát balanszer kromoszóma felett tartottuk, a penetrancia néhány generáció alatt 64%-ról ~10%-ra esett. A felnőtt állatok mutáns fenotípusainak kvantitatív jellemzését a 3. táblázatban foglaltuk össze. A $\Delta 1-2$ heterozigóta legyek *Polycomb* heterozigóta háttéren nagyobb arányban és mértékben voltak transzformáltak. Az érzékenyített háttéren kapott eredmények kiegészítik és megerősítik a „vad háttérű” $\Delta 1-2$ deléción kapott eredményeket: a *Polycomb* fehérje maga is részt vesz a *bx* PRE által közvetített géncsendesítés folyamatában. A $\Delta 1-2$ által okozott poszterior irányú transzformációk már lárvakorban is megfigyelhetők voltak (7. ábra).

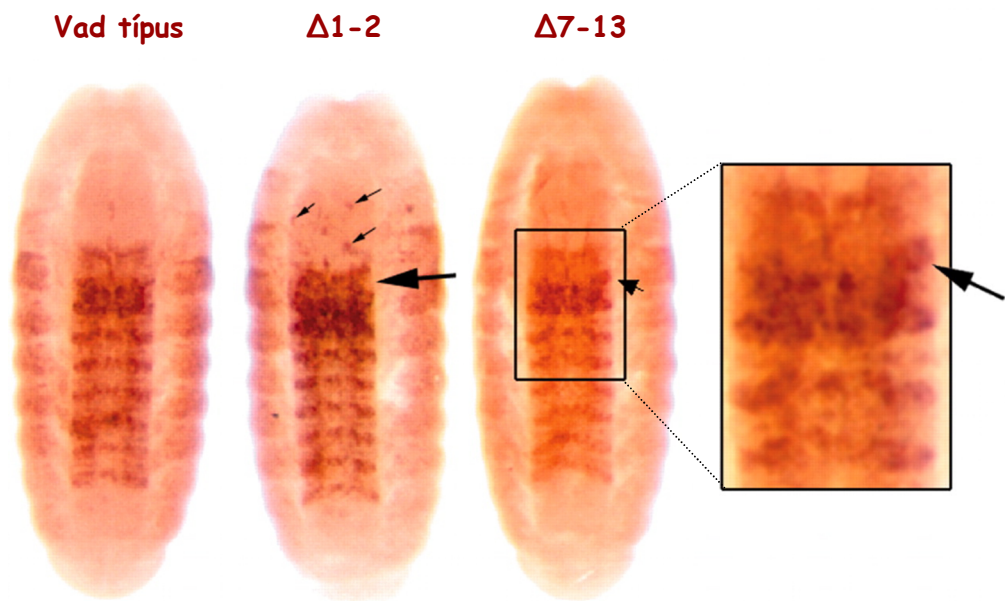
Az $\Delta 1-2$ heterozigóta állatok sohasem mutattak az előzőekkel ellentétes, anterior irányú transzformációkat, amelyek az *Ubx* funkcióvesztéses mutációját jelezték volna. Hemizigóta formában, érzékenyített háttéren (*Df(3R)pbx²*, *Df(3R)Ubx¹⁰⁹* és *Df(3R)P9*) is megvizsgáltuk a $\Delta 1-2$ kromoszóma fenotipikus hatásait. A hemizigóta állatokon a *Df(3R)Ubx¹⁰⁹/+* vagy *Df(3R)P9/+* heterozigótákhoz viszonyítva nem figyeltünk meg új vagy erősebb anterior irányú transzformációkat, a poszterior irányú transzformációk pedig mindhárom esetben majdnem olyan súlyosak és gyakoriak voltak, mint a homozigótákban. Az $\Delta 1-2$ kromoszómát a BX-C tandem duplikációjával [*Dp(3;3)P5*] heterozigóta formában hordozó állatokon még mindig láthatóak voltak poszterior irányú szelvénytranszformációk, ami megerősíti, hogy ez a deléción funkciónyeréses – és nem funkcióvesztéses – mutáció.

A felnőtt $\Delta 1-2$ legyek fenotípusai egyértelműen az 5. paraszelvény (PS5, a 2. torsiálszelvény poszterior széle és a 3. torsiálszelvény elülső része) 6. paraszelvénné (PS6, a 3. torsiálszelvény poszterior széle és az 1. potrohszelvény elülső része) történő részleges transzformációját jelzik.

		$\Delta 1-2/+$	$\Delta 1-2/\Delta 1-2$
Funkciónyeréses		64	98
Vad típus		36	2
Szárnny			
Anterior szárny halterává	Egyik oldal	6	4
	Mindkét oldal	0	1
Poszterior szárny halterává	Egyik oldal	7	7
	Mindkét oldal	0	0
Csökevényes allula	Egyik oldal	20	19
	Mindkét oldal	1	5
Csökevényes szárny	Egyik oldal	19	22
	Mindkét oldal	4	7
Tor (dorzális, laterális, ventrális)			
Csökevényes notum		1	2
T3 és A1 közötti árok		43	29
T3 és A1 között ektopikus A1-szövet	Egyik oldal	12	26
	Mindkét oldal	1	10
Ektopikus A1, T3 hiányzik, A1 megnövekedett	Egyik oldal	1	3
	Mindkét oldal	0	0
Ektopikus A1, T3 hiányzik, A1 normális	Egyik oldal	0	4
	Mindkét oldal	0	8
A szternopleurális régió halvány/transzformált	Egyik oldal	4	18
	Mindkét oldal	1	4
A szternopleurális szőrök redukáltak/hajlottak	Egyik oldal	9	27
	Mindkét oldal	1	10
A hipopleurális régió transzformált/hiányzik	Egyik oldal	32	12
	Mindkét oldal	9	85
A billérek hiányoznak/csökevényesek	Egyik oldal	1	6
	Mindkét oldal	0	3
A 3. láb hiányzik/csökevényes	Egyik oldal	0	3
	Mindkét oldal	0	0

3. táblázat A $\Delta 1-2$ delécio által okozott különböző poszterior transzformációk gyakoriságának megoszlása. A kiértékelés 100-100 felnőtt légy adatait tartalmazza. A1, 1. potrohszelvény; T3, 3. torszélvény.

Megfigyeléseinket az *Ubx* gén kifejeződésében tapasztalt eltérések is alátámasztják (8. ábra). Az $\Delta 1-2$ homozigóta embriókban megfigyeltük ugyanis az UBX ektopikus kifejeződését: a vad típusú PS6-ra emlékeztető festődés jelent meg a PS5-ben is. A PS5-ben legtöbbször az UBX



8. ábra Az *Ubx* kifejeződése a PRE-deléciós embriókban. Kb. 16 órás embriókat festettünk UBX-ellenanyaggal. A megnövekedett UBX-szintet leginkább a $\Delta 1-2$ homozigóta embriók fejlődő központi idegrendszerében figyelhetjük meg. Kiterjedt, erős ektopikus festődés látható a 3. torsiáselemben (nagy nyíl), de ettől előrébb elhelyezkedő sejtek is elvéve kifejezik az UBX-et (kis nyilak). A potrohszelemben a festődés megfelel a vad típusnak. A $\Delta 7-13$ homozigóta embrióban az UBX kifejeződési mintázata és szintje inkább a vad típusra emlékeztet, mindössze a 3. torsiáselemben egy kisebb területen találunk erősebb festődést (nyíl). A nagyított képen a $\Delta 7-13$ homozigóta embrió ventrális idegkötegeének a 3. torsiáselemtől a 3. potrohszelemyig húzóóó része látható.

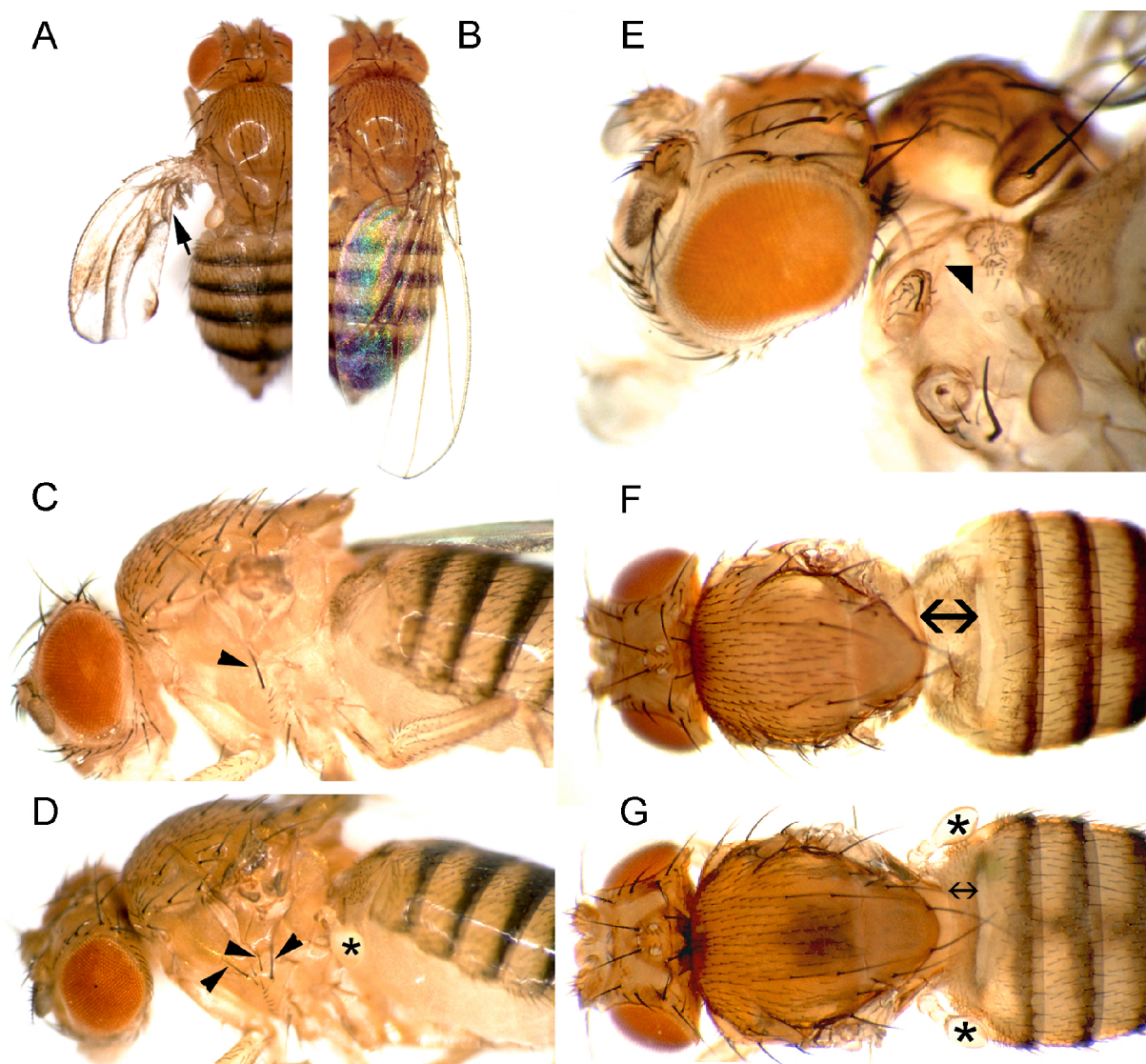
kissé megemelkedett szintjét tapasztaltuk, néhány esetben azonban drámaian megnövekedett UBX-koncentrációt láttunk. Sőt, elvéve a PS5-től előrébb lévő paraselemben is pontszerű ektopikus festődés jelent meg. Harmadik stádiumos lárvák központi idegrendszerében is hasonló, a vad típustól eltérő UBX-festődést találtunk a PS5-nek megfelelő régióban, néha a szárnydiszkuszban is pontszerű festődés mutatkozott. A vad és deléciós állatok agylebenyeit, szem-antenna-diszkuszait vagy első lábdiszkuszait összehasonlítva nem találtunk eltérést, az *Ubx* gén egyöntetűen represszált volt mindegyik genotípusban.

Funkciónyeréses fenotípust okozó kisebb deléciók a központi PRE-régióban

A 665 bp nagyságú $\Delta 1-2$ delécióval eltávolítottuk a halmozottan előforduló GAGA- és PHO-kötőhelyek jó részét (6. ábra B, 42. oldal), azonban nem volt világos, ezek közül melyek

szükségesek a PRE működéséhez. Ennek vizsgálatára olyan konverziós konstrukciókat terveztünk, amelyeket felhasználva tovább finomíthattuk annak a minimális szakasznak a behatárolását, amelynek eltávolítása még szelvénytranszformációkat okoz. Ezzel a megközelítéssel tehát meg tudtuk határozni azt a legrövidebb DNS-fragmentumot és az azt alkotó ismert kötőhelyeket, amelyek a *bxd* PRE esszenciális alkotóelemei. A ⑩ jelű konstrukciót felhasználva eltávolítottuk a $\Delta 1$ és $\Delta 2$ deléció találkozási pontját átfedő 280 bp-nyi szakaszt (6. ábra A, 42. oldal). A $\Delta 10$ kivágja a központi 4 GAGA- és 4 PHO-kötőhelyet, ami részlegesen megfeleltethető az egyik transzgenikus PRE-tesztben (Horard és mtsai., 2000) talált 2 legaktívabb fragmentumnak (BP és PF). Ez a 280 bp-os deléció a 664 bp-os $\Delta 1$ -2 delécióhoz hasonló poszterior transzformációkat okoz az öt hordozó legyekben. A ⑫ jelű konstrukciót a $\Delta 10$ által meghatározott szakasz egy belső, 127 bp nagyságú, mindössze 1 PHO- és 2 GAGA-kötőhelyet lefedő alfragmentumának kiejtésére terveztük (6. ábra A, 42. oldal). A $\Delta 12$ deléció nem eredményezett transzformációt. Végül a ⑰ számú konstrukciót használtuk fel a $\Delta 12$ deléció proximális irányban történő megnagyobbítására, ezzel eltávolítva még 3 PHO-helyet pluszban (6. ábra A, 42. oldal). Az így létrehozott 185 bp-os $\Delta 17$ deléció a $\Delta 10$ -hez hasonló jellegű és erősségű transzformációkat okozott (9. ábra), azonban a fenotípusok penetrancia-értéke kisebbnek adódott (78% a heterozigóta $\Delta 10$ és 24% a heterozigóta $\Delta 17$ esetén). A $\Delta 17$ által meghatározott 185 bp-os szekvenciát elneveztük *bxd* PRE-magnak.

Hasonlóan a $\Delta 1$ -2 delécióhoz, a heterozigóta formában fenntartott kisebb deléciók penetranciája is fokozatosan csökkent generációról generációra. Az eredeti értéket részben vissza tudtuk állítani a deléciós legyek vad típushoz történő kikeresztezésével, habár ennek mértékét nem elemeztük kvantitatív módszerekkel. Ezek után megvizsgáltuk a homozigóta törzseket is: a két nagyobb deléció ($\Delta 1$ -2 és $\Delta 10$) esetén a penetrancia közel 100% volt, és a törzs fenntartása során stabil is maradt, míg a PRE-magot eltávolító $\Delta 17$ penetranciája homozigóta formában is csökkent. A transzformációk erősségét tanulmányozva megállapítottuk, hogy az csak a legnagyobb ($\Delta 1$ -2) deléció esetén volt állandó, a két kisebb deléciót ($\Delta 10$ és $\Delta 17$) hordozó homozigóta törzsekben egyre gyengült.



9. ábra Példák a 185 bp-os *bxd* PRE-mag deléciójára heterozigóta nőstény legyeken tapasztalható poszterior transzformációkra. (A, C, E és F) Mutáns legyek, amelyekből eltávolítottuk a *bxd* PRE-magot. (B, D és G) Vad típusú legyek. (A) A második torsiálszélvénnyé történő transzformációját a szárnylemez hátsó részének redukciója és részben billérré (nyíl) történő transzformációja jelzi. (C) A harmadik torsiálszélvény részlegesen első potrohszélvénnyé alakult, amit a billér hiánya mutat. A billért a vad típusú állaton csillaggal jelöltük (D). (C) Ezen az állaton a szternopleurális szőrök számának csökkenésén keresztül (nyilak) a második torsiálszélvény harmadikká történő részleges transzformációját is megfigyelhetjük. Az (E) állaton a notum erős redukcióját láthatjuk (a bal oldala hiányzik). A háromszög egy ektopikus A1 klónra mutat. A vad típusú (G) állaton csillagokkal jelölt billérek a mutáns (F) legyekről a T3 A1-gyé történő transzformációja miatt hiányoznak. Következésképpen az A1 megnagyobbodott a vad típusú állat (G) A1 szélvényéhez képest (dupla nyilak).

A környező szakaszok vizsgálata

Korábban a 3 kb nagyságú *bxl* PRE vizsgálatára transzgenikus és immunoprecipitációs megközelítéseket alkalmazó csoportok (Horard és mtsai., 2000; Tillib és mtsai., 1999) arra a következtetésre jutottak, hogy a régió több, egymással redundáns funkciójú PRE/TRE modulból épülhet fel. Ezek közül a két szélső szakasz mindössze néhány GAGA- és PHO-kötőhelyet tartalmaz, valamint részben átfed olyan fragmentumokkal, amelyekre az S1 és S2 embrionális enhanszereket térképezték (6. ábra C, 42. oldal) (Pirrotta és mtsai., 1995). A fenti adatokból kiindulva a központi PRE-régiót körülvevő DNS-szakaszok szerepét is megvizsgáltuk. A központi régiótól balra (az 529 bp-os $\Delta 7$ és a 925 bp-os $\Delta 8-3$) és jobbra (a 646 bp-os $\Delta 13$ és az 1843 bp-os $\Delta 4-13$) elhelyezkedő deléciókat homozigóta vagy heterozigóta formában hordozó legyek azonban egyaránt vad fenotípusúnak mutatkoztak (6. ábra D, 42. oldal). Ez az eredmény a $\Delta 4-13$ esetén különösen meglepő volt, hiszen ez a deléció kivágja azt a szakaszt, amely a különböző rokon *Drosophila* fajok között végzett összehasonlító elemzésben a *bxl* PRE legkonzerváltabb részének bizonyult (Dellino és mtsai., 2002).

Ezzel ellentétben azok a delécióink, amelyek az esszenciális 185 bp-os szakasszal együtt annak bal ($\Delta 8-4$, *Sce* Δ G) ill. jobb ($\Delta 17-19$, $\Delta 2-19$) oldaláról is eltávolítanak nagyobb részeket, a $\Delta 10$ -hez hasonló funkcionyeréses fenotípust okoztak (6. ábra D, 42. oldal). Érdekes módon a transzformációkat egyik esetben sem találtuk súlyosabbnak a $\Delta 10$ -hez képest. Ez azért volt meglepő, mert a $\Delta 10$ és $\Delta 17$ esetéből kiindulva azt vártuk volna, hogy a nagyobb deléciók gyakoribb és/vagy súlyosabb fenotípusokat eredményeznek.

A 6.C ábrán (42. oldal) látható transzgenikus kísérletekben azonosított középső TRE (Tillib és mtsai., 1999) szerepét is megvizsgáltuk. Ebben az esetben az *in situ* deléciókat egy olyan kromoszóma I-SceI enzimmel történő hasításával készítettük, amely az enzim felismerőhelye mellett már eleve hordozta a $\Delta 1-2$ deléciót. A módszer kiválóan működött, számos deléciót sikerült létrehoznunk (*Sce* Δ A-*Sce* Δ F, *Sce* Δ H, *Sce* Δ I), amely a $\Delta 1-2$ deléciót proximális irányban megnövelte. Ezek közül 2 (*Sce* Δ A és *Sce* Δ C) a TRE kisebb darabjait távolítja el, a többi a teljes TRE-t. Érdekes módon a fenotípus egyik esetben sem tért el a $\Delta 1-2$ esetében tapasztaltaktól. Az eredmény magyarázata az lehet, hogy a másik 2 *bxl* TRE helyettesíteni képes a hiányzó funkcióját. Ebből kiindulva kivágtuk a teljes *bxl* PRE/TRE-régiót is. A $\Delta 7-13$ deléció által eltávolított 3036 bp-os szakasz magában foglalja mindhárom vélelmezett PRE/TRE-t, a TRE1 transzkriptum első 40 bázisát kivéve a TRE-kről képződő RNS-

templátokat (Sanchez-Elsner és mtsai., 2006), valamint az S1 és S2 enhanszereket tartalmazó fragmentumok egy-egy részét is (6. ábra, 42. oldal). A heterozigóta ($\Delta 7-13/+$) és hemizigóta ($\Delta 7-13/pbx^2$) állatok mégis életképesek voltak, sőt nem mutatták a $\Delta 1-2$ és más kisebb deléciók esetén tapasztalt poszterior transzformációkat sem. A homozigóta $\Delta 7-13$ legyeken azonban – a szárnytranszformációk kivételével – megfigyeltük a $\Delta 1-2$ -re jellemző fenotípusokat. A $\Delta 7-13$ kisebb deléciókhoz viszonyított enyhébb funkciónyeréses fenotípusaira nem ismerjük a pontos magyarázatot, de úgy gondoljuk, a jelenségért az S2 enhanszer részleges eltávolítása lehet a felelős. Elképzelésünk szerint az S2 enhanszer optimális működése előfeltétele annak, hogy az *Ubx* ektopikusan kifejeződhessen. Ezt a hipotézist az S2 enhanszer *in situ* boncolásával valószínűleg igazolni lehetne, az erre irányuló kísérleteket a jövőben tervezzük elvégezni.

Annak ellenére, hogy a *bxd* PRE-régióból kiejtettünk minden ismert és feltételezett TRE-t, nem kaptunk anterior irányú transzformációkat. A $\Delta 7-13$ homozigóta embriók UBX-festődése inkább a vad típusú embriókéra emlékeztet, csak a 3. torsiálszelvényben (PS5) jelenik meg ritkán a $\Delta 1-2$ embriókéhoz hasonló, egyébként az 1. potrohszelvényre (PS6) jellemző mintázat-rész (8. ábra, 47. oldal). A $\Delta 1-2$ homozigóta embriókhoz hasonlóan a $\Delta 7-13$ homozigótákban sem tapasztaltunk sehol funkcióvesztéses mutációra utaló csökkenést az UBX fehérje kifejeződési szintjében.

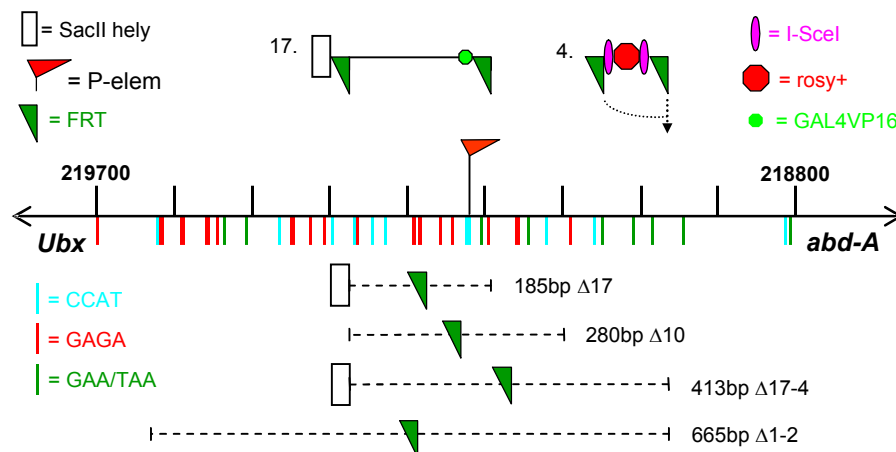
PRE-duplikációk

Transzgenikus konstrukciókba többszörös kópiában beépített *bxd* PRE-darabok képesek voltak gátolni a szomszédos riportergén átíródását (Horard és mtsai., 2000). Kíváncsiak voltunk arra, vajon megváltozik-e az *Ubx* gén működése, ha olyan kromoszómákat állítunk elő, amelyek eredeti pozíciójukban tartalmazzák két kópiában a PRE bizonyos részeit. A konverziós kromoszómák FRT-helyei között rekombinációt indukálva az FRT-szekvenciák által közrefogott PRE-szakaszok tandem duplikációit tudtuk előállítani. Ezt a stratégiát alkalmaztuk a ④ és ③ (268 bp-os duplikáció), a ④ és ⑨ (664 bp-os duplikáció), valamint a ④ és ⑧ jelű (1193 bp-os duplikáció) konvertánsok esetében. Fontos, hogy markergén egyik esetben sem maradt a duplikációkat tartalmazó kromoszómákban. A duplikációkra heterozigóta vagy homozigóta állatok egyaránt vad fenotípusúak voltak. Még érzékenyített háttéren – egy kópia *Ubx* gén jelenlétében – sem találtunk olyan fenotípust, amely az *Ubx* gén lecsökkent működésére utalt

volna. Úgy tűnik tehát, hogy a *bxd* PRE „megerősítése” a tandem duplikáció által nem befolyásolja az *Ubx* gén normális működését. Ezzel szemben, a teljes BX-C tandem duplikációja [*Dp(3;3)P5*] részlegesen visszaszorítja az *Ubx* gén ektopikus derepresszióját, közelíti a vad típushoz: ahogy korábban említettük, a *Dp(3;3)P5* részben szupresszálta a $\Delta 1-2$ funkciónyeréses fenotípusát. Úgy gondoljuk, ezt a részleges szupressziót a deléciós kromoszóma és a *Dp(3;3)P5* kromoszómán lévő két kópia *bxd* PRE vagy a BX-C-ben található más PRE-k közötti kölcsönhatás eredményezi.

A PRE-mag helyettesítése más szekvenciákkal

Mivel minden PRE különböző nukleotidsorrenddel rendelkezik, nem tudjuk, mik azok a feltételek, amelyeknek szekvenciaszinten teljesülniük kell ahhoz, hogy egy adott szakasz PRE-ként működjön. Az sem világos, hogy az egyes PRE-k tartalmaznak-e az ismert kötőhelyeken kívül más, csak az adott PRE-ra jellemző szekvencia-motívumokat. Továbbfejlesztett módszerünk lehetővé tette, hogy a *bxd* PRE magjának más szekvenciákkal történő helyettesítésével közelítsük meg a kérdést (10. ábra). Először hat különböző, BX-C-ben található PRE-t (Mihaly és mtsai., 1998) vizsgáltunk meg két fehérje-kötőhely előfordulása



10. ábra A *bxd* PRE központi részének vizsgálatára és a PRE-mag helyettesítésére használt főbb konstrukciók vázlata. A folytonos vonalak genom DNS-t, a szaggatott vonalak deléciókat jelölnek. A koordinátákkal ellátott genomtérkép alatt elhelyezett függőleges színes vonalak a következő fehérjék lehetséges kötőhelyeit mutatják: GAGA (piros), PHO (kék) és DSP1 (zöld). A *SacII* hasítóhelyre építettük be azokat a DNS-szekvenciákat, amelyekkel helyettesíteni kívántuk a *bxd* PRE magját.

szempontjából. Mind a hat PRE-ban megtalálható ez a két fehérje-kötőhely, amelynek szerepet tulajdonítanak a PRE-k által közvetített represszióban. A CCAT-motívum (Mihaly és mtsai., 1998) a PHO (Brown és mtsai., 1998) és a PHOL (Brown és mtsai., 2003) fehérjék konszenzus kötőhelye. A GAGA szekvencia a GAGA-faktor és a PSQ fehérje kapcsolódási helye (Lehmann és mtsai., 1998). A halmozottan előforduló CCAT- és GAGA-helyek mintázatában a legnagyobb hasonlóságot a *bxd* és az *iab-7*, valamint az *iab-5* (vagy másnéven *Mcp*) és *iab-8* PRE-k között találtuk (11A. és 11B. ábra, 53-55. oldal). A CCAT és a GAGA kötőhelyek a véletlenszerűhöz viszonyított halmozott előfordulása kevésbé kifejezett az *iab-2* PRE-régióban, az *iab-6* PRE-ra pedig nem is jellemző.

A fehérje-kötőhelyek mintázatában talált hasonlóságból kiindulva elhatároztuk, hogy a *bxd* PRE 185 bp-os magját helyettesítjük az *iab-7* és az *iab-5* PRE-k „használt” szakaszaival. Ez utóbbi szakaszok pontos kijelölésekor a kötőhelyek elhelyezkedésén kívül figyelembe kellett vennünk azt is, hova tervezhetők megfelelő PCR-primerek. A PCR módszerrel előállított 191 bp-os *iab-7*-fragmentum jó átfedést mutatott a Mishra és mtsai. (2001) által azonosított minimális

A

bxd PRE-régió (185 bp)

```

219001 gaatacaagc ccgaaaaaga agaagaagcg gcggaagaac gcactcaaaa tccgaaaatg
219061 agccataaaa cccagtgcg aatgctact gctctctagg ccacgcccc ttcacacgga
219121 agccataacg gcagaaccaa agtgccgata actcaaaaag agagagggtc attccaagtc
219181 tgacgtgctg t aagagcgaga tacagataag actacgcgca ccataatggc tgcgccgtaa
219241 agcgagagcg atccgagcga gaaggctaac cgtatctctc cctctctcgc cagtcgcggc
219301 gcagtcgctg cctctgcgc tccgtcgcca taactgtcgt tcgtaatggc cgttttaagt
219361 gcgactgaga tggcctcata atcgtttgc gaactcgaat ggtttgctctc aattggttgg
219421 tgctctcttt cgccttgctc tttctctctc cgtcggttgc gtttgcctat gtttgcctat
219481 taattagtag tgatttaatt gccagtgaa aatttggcag cttgcaaaag cggctatgaa

```

iab-7 PRE-régió (191 bp)

```

83221 taatttccgt cttaatatct actattattt ttagagtatt aacaaggctt ttccaagaac
83281 atcagtttgc tatgcgaggt atagataaaa tagctttcca taattaaata aatccaacat
83341 tatcatttct tttcagcccc gaaaatgcc acaaaaatgc cgtcggcgga atcgaaaatg
83401 tcggcaattc ggattcccg cgaagaggca gtggatttaa tggagcccca tgatggccga
83461 gctgaaaatg aagaagaaga ggcgagacag cggcagccat catggatgtg aaagagagcg
83521 tgctcttggc ctctctcgc cgcgtcgtg cctacgacag tgcggtattc cacagcggcc
83581 atgctcgtc catgctgctc tgcctgccac tcacctgcga cgtcgtctgt tgtgaagtgc
83641 ttgcgacgtg agcgaccgaa actcggggcc ccgaaaact agaggcccaa aaaacaggat
83701 tgtgagcgag cgaggagcg gaggaatttc gagggacttt ctgcgactgc gtcgtcggcc
83761 agacaaaaac aa

```


Mcp PRE-régió (189 bp)

```
113641 gttttaacta cagtccaata aactgataag cagagcagaa aaaaccgaaa aaaaatctag
113701 aaaaattccg caccagctgc atactgcgca tgagctccca ttttcagggg taacaaagcg
113761 caaathtagt tgacaaaatc gacttaaacy cagaagatac atttactacc cacacaaacy
113821 catctgcagt caaacgtcac acagatacaa tgtcggaaaa agaggccatg ttttcagagg
113881 cagccatcaa tgttgccatc tttgtcgcgc ggccatgtat tatgtgtaag gaggaagact
113941 acatcaataa gctgtgtgtc tcaacttactc tcacgcacta acacatgaga aacccaagcg
114001 ttgtaagtgt gcgtaatgcy tttccaacag cgagcgtcct ctggtgggtt gtcagcaaag
114061 cataagctgc aaaagaaaaa caataggggg cgccagcgca aaaggtttgg atattggcta
114121 aatttatgta acaataaat ttttaaatta tttaaatcac ttaaaaaata gtgataaaat
114181 aaatctaagt ctgagttaag tttaaaatat atttattaag atataattta tttcttcccc
```

iab-8 PRE-régió (200 bp)

```
62581 tttcccgag ctggagcccc ggtgttgag tcccggagtt ggaggccgcy gcacccatga
62641 gatatacata agccatcccg cttttaattg cctgcctaga ctgtagtcgt tcccatattg
62701 agcgcaccag ctcatattgca taaatttatc gaaatgaaaa tcagcgacgg aaaagcctga
62761 aaatcctgtc cctgccagtt tttctcttcc accacttttc tctgtccgct ttcgcccca
62821 ttttcgctgg tactgcgcac gtgcgctct gccatcagag gccattataa aatgggcgga
62881 gccaaagagcc gttagctcac caccggcctta gcgtgccgtg gtgagtttcg aaatcgaccc
62941 ttgttgtccg cgttgaggtg gaaagagac agactgagct ggatattgaa tagaaccctt
63001 aggatatacy atgtccatga cagttcccg aatatctagt gcccgcatgt ctttttttct
63061 gaaaataact gaaaactaat atttgtgttt tgaactcagc tactagcaat tatatgtgaa
63121 agttaggttg ttatagttac gtatatttgt taaaattact ttttccatta catatataaa
63181 ttacgtcgcy aaactaaaaa tttatttaca aattggaaac agggaatgct gctcccaaaa
63241 tttcaaattt gtaaatatt attttattac aaagggtgac aaacggagca gataattaaa
```

iab-2 PRE-régió

```
171241 gaactgcagt tggcattgga aaatcaataa caaagttggg ccgtgactca aagtgagcgc
171301 tctccttttc gctcagatcc acattcacat ccacgtgtga gtgctctctt gcgaattccg
171361 gtttggtcgc gccgactcac cactcacact aagaaaaaac tcaggcgttg ccatgccgac
171421 gttttgctct ttccctctct ctatgacaat gtgtgtgtgt gtgtctacct gtgcgaaggc
171481 agacactgcy gcagccatgt tggattccat cactccgtcc tgcgagccag cagccatctc
171541 gctcgcacct gcgcttagcc attggcggcc attgcggggg tcgtaaatct tgtttagggg
171601 cgcgtgtgtc ctgggagtcy tgatttatgg gacgaattgt agctgctcat tgtagcgtgt
171661 aaataattta gattagtttg gtattcctgg ccacaggata gcagggggaa aacgggaaag
171721 gggggttgat tagaattgaa attgctattg ccccttccc tttacactgt ttctgttca
171781 ctccagtaac aatgttttcc gatttttatt gctgctctc ttaaattaaa agcaaagtat
171841 agtgtttgtt taacaagaaa ttaattttaa agattaattt gaatttaatt atcgggataat
```

iab-6 PRE-régió

```
100561 ggggtcggca cagcagcgcc gctgcccggc cgaaccggca gtctgccag tggagagatc
100621 aaagataccc agatacattt acattgatgt tatccttcag ctgcaactgc agcctcggga
100681 gacgaattcc aatcgccgca ttaaagcagt ccgccagggg gcgctcgcgt gcgtttatct
100741 tgcyatggct gcggcaaaagc aaatcggtt tagctgccg tcggccatct tggatttatc
100801 tggcaatcac atttgtcaga tactttcgaa gcgctgtgcy tccttttctc gcacatgcy
100861 atagtggcgt ttcaggcgtg gcaacgtcga cgtcgacagc ggccggcagct gcgtcgccca
100921 cgcacaccac tgcacgcagc aataccagcy catttcgtac cgcctccaac cgcgctcat
100981 tcagacctgg cctcagagcc cgtatctgag gccaaagaa cgcacttatt tattgaaact
101041 cgttggtgct cttcgggact ctgacccggg gatctctata ctcatagata ataccccgaa
101101 ccatcaacgc attggattta gtcattctca actggggcct cttgaataa aaatatttct
101161 accagctatt acatttaata aaacatatta taaataacat aattaaaata ttttttaatt
```

```

101221 aataacataa aataagtatt ggaacgcttt aaatattttt ctttacccaa taccaagact
101281 ttcgtaatcg ttccatttta aaacatttct ttcatttcta taagatataat tttaatatatt
101341 ccacatttta atccgctgtg ttttctatta ttatattttc ttatgatata tttaacattc
101401 cgcaatttat attcaatagt attttgtagt gcaaagggt ccatctaaat taatttaata
101461 caatttaata agcattttac agatatagtt gttcatagtt gttagtggac cgaatttaat
101521 ttggtcgact tgccgacggc acttcaagct cgctttgaaa tacgctcttt tcagttccgc
101581 cttactgttt gctggcattt atgcaaattg ctgtattgcg gaccacacac tggcaccagc
101641 taattgacaa ttagctgaca aatgctaatg gtgaatgcca ccgacccatt ggaatggaga
101701 ctcgcagcct tgactaattg aggcgacaat tggcgcgcc cagaatttat tcaagccacg

```

B

bxl PRE-mag (185 bp)



iab-7 PRE-fragmentum (191 bp)



Mcp PRE-fragmentum (189 bp)



iab-8 PRE-fragmentum (200 bp)



11. ábra A BX-C PRE-szekvenciáinak összehasonlítása. (A) A GAGA(G)- (piros) és a CCAT- (kék) kötőhelyek előfordulása a BX-C 6 PRE-régiójában. A két motívum átfedéseit ciklámen színnel emeltük ki. Az aláhúzással jelöltük a 185 bp-os *bxl* PRE-magot, valamint az *iab-7* és *Mcp* PRE-k azon részeit, amelyekkel a *bxl* PRE-magot helyettesítettük. Szaggatott vonallal húztuk alá az *iab-8* PRE 11.B ábrán feltüntetett részét. Az aláhúzott szakaszok mérete a szekvenciák felett zárójelben látható. **(B)** A GAGA(G) (piros vonal) és a CCAT (kék vonal) motívumok mintázata a BX-C-ben található 4 „leg hasonlőbb” PRE-ban.

funkcionális *iab-7* PRE-val, amely 230 bp méretűnek adódott. Az általunk előállított 189 bp-os *iab-5*-szakasz szintén jó átfedést mutatott a korábban azonosított 138-bp-os minimális *iab-5* PRE-val (Busturia és mtsai., 2001). A felszaporított *iab-7*- és *iab-5*-fragmentumokat beépítettük a kiejtendő PRE-mag mellé. Mivel nem ismert, hogy a PRE-k rendelkeznek-e irányultsággal, és ha igen, ezt mi határozza meg, mindegyik, az „idegen” PRE-fragmentumok különböző orientációinak megfelelő konverziós donor plazmidot elkészítettük. A sikeres konverzió

keresztülment kromoszómákat azonosítottuk, majd Flipáz enzimmel rekombinációt indukáltunk az FRT-szekvenciák között. Az FRT-k által közrefogott *bx*d PRE-mag és a markergén eltávolítását a GFP-fluoreszcencia megszűnése jelezte számunkra.

A különböző *bx*d PRE-mag mutációk által okozott fenotípusok kvantitatív értékelésében a legnagyobb nehézséget az jelentette, hogy már a kontroll deléció ($\Delta 17$, 185 bp) által okozott transzformációk erőssége és penetranciája is a heterozigóta törzsben generációról generációra fokozatosan csökkent a kezdeti (F1 generáció) 24 %-os penetranciához képest. Hasznos lett volna a fenotípus penetrancia-értékeit a delécióra homozigóta törzsben is vizsgálni, ez azonban több okból sem volt lehetséges. Egyrészt az F2 generációban nagyon ritkán keltek ki homozigóta legyek, másrészt a penetrancia-érték generációról generációra csökkent a homozigóta törzsben is. Így mire a delécióra homozigóta törzset sikerült annyira felszaporítanunk, hogy az statisztikailag szignifikáns számú egyed tartalmazza, a homozigóta legyeknek már csak 8 %-a mutatott valamilyen transzformációt. A $\Delta 17$ homozigóta állatok nagy része bábozódás előtt elpusztult; viszont az életképes egyedek nem mutattak erősebb fenotípust heterozigóta szüleiknél. Az UBX fehérje kifejeződési mintázatának vizsgálata szintén nem vezetett eredményre az egyes „kicserélt” *bx*d PRE-magokat tartalmazó törzsek összehasonlítása szempontjából. A $\Delta 17$ embriók T2 szelvényében nem láttunk ektopikus pöttyöket, a T3 szelvényben tapasztalható volt ugyan az UBX szintjének emelkedése, de ez annyira enyhe volt, hogy nehéz lett volna a különbséget objektíven értékelni. A $\Delta 17$ lárvák szárnydiszkuszaiban szintén nem találtunk ektopikus UBX-festődést. Mindezek alapján úgy döntöttünk, hogy a „kicserélt” *bx*d PRE-magok fenotipikus hatásait abban a generációban elmezzük, amelyben először azonosítható a „vad” PRE-mag deléciója, ilyen módon ugyanis az eredmény több független kísérletben reprodukálható volt.

A kicserélt „idegen” PRE-kra heterozigóta állatok vad típusúnak bizonyultak mindkét PRE esetén (4. táblázat). Az sem számított, melyik orientációban ültettük be őket a *bx*d PRE-mag helyére. A homozigóta állatokon sem láttunk semmilyen anterior vagy poszterior transzformációt. Ezután egy szigorúbb tesztben is megvizsgáltuk az ektopikus PRE-k viselkedését: a 185 bp-os deléciót disztális irányban megnöveltük 228 bp-ral a homológ kromoszómákon található FRT-szekvenciák közötti rekombinációval (5. ábra, 40. oldal). A kísérletet az indokolta, hogy – bár ennek a disztális szakasznak az eltávolítása önmagában nem okoz szelvénytranszformációkat – a 185 bp-os deléció 95 bp-ral történő megnövelése ($\Delta 10$)

mintegy 3,5-szörös emelkedést eredményezett a fenotípus penetranciájában. Azonban az ektopikus PRE-k mellett megnövelt *bx*d PRE-deléció heterozigóta formában hordozó állatokon sem vettünk észre transzformációt (4. táblázat). Az *iab-7* és az *iab-5* PRE-k tehát teljes mértékben helyettesítették a *bx*d PRE-ből hiányzó 413 bp hosszú szakasz funkcióját.

Genotípus	N	PT [%]
<i>iab-7</i> ^{CS}	708	0
<i>iab-5</i> ^{CS}	417	0
H1 ^{CS}	871	32,9 ± 1,8
H2 ^{CS}	1118	37,5 ± 3,5
GAGA*	661	1,84 ± 0,16
PHO*	354	4,06 ± 0,17
GAGA*+PHO*	789	27,5 ± 3,1
Δ17 (185 bp)	750	24,2 ± 2,4
GAGA*+DSP1*	1143	1,51 ± 0,11
PHO*+DSP1*	553	5,16 ± 0,33
ΔMN+GAGA*	141	4,35 ± 1,65
ΔMN+PHO*	123	28,5 ± 1,1
ΔMN+GAGA*+PHO*	147	63,7 ± 10,2
ΔMN+ <i>iab-7</i> ^{CS}	207	0
ΔMN+ <i>iab-5</i> ^{CS}	158	0

4. táblázat A PRE-cserék és a *bx*d PRE-mag kötőhelymutációi által okozott fenotípusok penetrancia-értékei. ()^{CS} = PRE-csere, ()^{*} = elrontott kötőhely(ek), ΔMN = megnagyobbított deléció, N = a kiértékelt legyek száma, PT = a poszterior transzformációk penetranciája

Az NCBI weboldalán található programmal megvizsgáltuk, hogy a 185 bp-os *bx*d PRE-magnak vannak-e homológjai az emlősök elérhető genomszekvenciáiban. Tekintve, hogy a PRE-k nem azonosíthatók klasszikus homológiakereséssel, nem volt meglepő, hogy mindössze

egy 20 bp hosszú fragmentummal találtunk homológiát. *Homo sapiens*-ben és *Gorilla gorilla*-ban ez a homológia 100%-os volt. *Rattus norvegicus*-ban az előzővel részben átfedő, 19 bp-os szakasz mutatott teljes azonosságot a *Drosophila* szekvenciával (lsd. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK). A megtalált emlős nukleotidsorrendek a genomok nem-kódoló régióiban találhatóak. A 20 bp-os homológ szakasz közelében találtunk 1 GAGA- és 3 CCAT-helyet a humán genomban (12. ábra). Kiválasztottuk azt a klónozható 263 bp-os szakaszt (H1), amely tartalmazta mindezeket, és az előzőekhez hasonlóan helyettesítettük vele a *bx*d PRE magját. Kontrollként kijelöltünk egy olyan fragmentumot (H2, 222 bp) a H1 közelében, amely nem tartalmazta egyik kötőhelyet sem. A magjától megfosztott *bx*d PRE-ba ültetett humán szekvenciákra heterozigóta legyek nagy gyakorisággal mutatták azokat poszterior transzformációkat (4. táblázat), amelyeket a *bx*d PRE kritikus szakaszainak önmagukban történő

```

110461 gtgcagcctc ctgatgggtc cccatcccgc ctctctgcca tgccccgcat caaaccceag
110521 tgacgactac gatgacacag acgatgacga ccctttcaac cctcaggtac tggatgcctg
110581 ggtctgaggg aggagggggc gggggctctg aactcctggg tctgagggag gaggagctga
110641 gggcctggcc gcctgggtct gagggaggag gggctggggc ccggactcct ggggtctgagg
110701 gaggaggggc tggggtccca cagtacaaag ccaattccca ctccattccc tctctctccc
110761 cgctaccccg aatctctctag caggaatcca agcgctttgt gcagtggcag tcgtctatct
110821 gagccctcc tcccggttg actggagcct ggctccctc ttctggtgagc ttccaagggc
110881 caccacagct cctgcagccg ggcctctgcc cccctcccgc cctccgagct gctccaggca
110941 tgggctgctg gcctcctgct ggggtggatcg caccgggcag gccctccagc ctgcattcct
111001 gccctgTCTC TCCCTCTCTC CGCAGTtctt tccttggtg ccggaggaga cccactaac
111061 ccagcctgcc tgggctctga ccactaacac tcttggccat ggacagcctg cacaggaccg
111121 cctccctgct cttggccact gtgtcccat ttctgtcctt ggccttggga gtagctgagg
111181 gggcagacta gggagtaggg ctggcagggg agggggcaga cagcctcgcc tcgcaccctt
111241 catccctggc tgccgggtcc atccttggag ggactaagct gggggtgagg gacatgagtc
111301 cccctgctgc ccctgccaca tccagtgagg ctctgacccc ctgatctcaa ctcgtggcac

```

12. ábra A PRE-cserékhez felhasznált humán szekvenciák. A H1 szakaszt aláhúzással jelöltük, a kötőhelyek színekkel megegyezik a 11. ábrával. Nagy nyomtatott betűkkel szedtük a *Drosophila bxd* PRE-maggal 100%-os azonosságot mutató 20 bp-t. A H2 szakaszt zöld színnel emeltük ki. A feltüntetett szekvencia elérési kódja (accession number): AC008746.

eltávolításakor is tapasztaltunk. A penetrancia-értékek kicsit még magasabbak is voltak, mint az „egyszerű” $\Delta 17$ -re heterozigóta legyek esetében, amelyek nem hordoztak extra szekvenciát (H1: $32,9 \pm 1,8\%$; H2: $37,5 \pm 3,5\%$; $\Delta 17$: $24,2 \pm 2,4\%$). A GAGA- és CCAT-kötőhelyeket tartalmazó humán H1-fragmentum tehát nem képes helyettesíteni a *bx*d PRE-mag funkcióját, sőt úgy tűnik, a H2 – és talán a H1 is – az épen maradt környező *bx*d PRE működését bizonyos mértékben még gátolja is.

A PRE-magban található fehérje-kötőhelyek elrontása

Ahogy a 11A-B. ábrán (53-55. oldal) is bemutattuk, a *bx*d PRE 185 bp-os magja 5 CCAT- és 6 GAGA-motívumot tartalmaz. DNáz I „footprinting” kísérletekben bizonyították, hogy a GAGA és a PHO fehérjék valóban kötődnek ezekhez a motívumokhoz (Mahmoudi és mtsai., 2003). Kíváncsiak voltunk arra, ezek a kötőhelyek milyen mértékben járulnak hozzá a PRE funkciójához, ezért elkészítettük a 185 bp-os szakasz olyan változatait, amelyekben a GAGA- és/vagy a CCAT-helyek hibásak. Ezeket a szintetikus DNS-fragmentumokat a fentiekhez hasonlóan beépítettük a konverziós donor konstrukcióba (10. ábra, 52. oldal), előállítottuk a konvertáns legyeket, majd eltávolítottuk a kromoszómából a PRE-mag vad kópiáját. Mindegyik esetben az elrontott kötőhelyekre heterozigóta állatok legalább két párhuzamos vonalát vizsgáltuk mutáns fenotípus szempontjából. A poszterior szelvénytranszformációk penetranciája a GAGA-helyekre mutáns legyekben $1,84 \pm 0,16\%$ volt (4. táblázat, 57. oldal). A mutáns CCAT-helyek esetében ez az érték $4,06 \pm 0,17\%$ -nak adódott. Ha mindkét kötőhelyet elrontottuk, a transzformációk gyakorisága $27,5 \pm 3,1\%$ volt. A kétféle elrontott kötőhely esetén tapasztalt magas penetranciaérték átfedett a PRE-mag teljes hiánya által okozott penetranciatartománnyal ($\Delta 17$: $24,2 \pm 2,4\%$). Tehát a GAGA- és CCAT-kötőhelyek speciális – bár pontosan nem definiált – kombinációjának jelenléte feltétlenül szükséges a *bx*d PRE magjának optimális működéséhez. Ugyanakkor ha a magon belül csak az egyik típusú kötőhelyet rontjuk el, és a másik érintetlen marad, akkor az ép kötőhelyek nagymértékben képesek ellátni a hibás motívumok funkcióját. Feltételeztük, hogy ehhez a maggal szomszédos szekvenciák „segítségét” is igénybe veszik; ezt vizsgáltuk meg a következő kísérletekben.

Az elrontott kötőhelyeket tartalmazó PRE-mag melletti 185 bp-os deléciót – a fentiekhez hasonlóan – az FRT-helyek közötti rekombinációval ismét megnöveltük 413 bp nagyságúra. Ez a nagyobb deléció a PRE-mag kötőhelyein kívül kivág még 2 GAGA- és 2 CCAT-motívumot. Az

ilyen légyvonalakban a transzformációk penetranciája $4,35 \pm 1,65\%$ volt az elrontott GAGA-helyek esetén, és $28,5 \pm 1,1\%$ -nak adódott a mutáns CCAT-helyek esetén (4. táblázat, 57. oldal). Végül azok a legyek, amelyekben a 413 bp-os deléció mellett mindkét kötőhelyet elrontottuk, extrém magas gyakorisággal mutattak funkcionyeréses fenotípusokat ($63,7\% \pm 10,2\%$). Ez az érték megközelítette a $\Delta 10$ (78%) és a $\Delta 1-2$ (64%) deléciók penetranciáit. Tehát – várakozásunknak megfelelően – a PRE-maggal szomszédos szekvenciák is nagymértékben pótolni képesek a PRE-magban elhelyezkedő egyik vagy másik kötőhely szerepét.

A GAAAA-szekvencia – amely számos PRE-ban megtalálható – egy nemrégiben megjelent közlemény szerint fontos szereppel bír a PRE-k felépítésében és működésében (Déjardin és mtsai., 2005). Úgy gondolják, ez a motívum a DSP1 fehérjét köti. A 185-bpos *bxd* PRE-magban mindössze egy GATAA-kötőhely található, amelyet a szerzők a DSP1-kötőhely egy lehetséges variánsának jelölnek meg. Ez a motívum a BX-C közzétett szekvenciájában (Martin és mtsai., 1995) a 219203. pozícióban található meg. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy a P-elem közvetítette ivarsejtvonal-transzformációkhoz és a génkonverziós kísérletekhez egy olyan törzset (*cn¹; ry⁵⁰²*) használtunk, amely ebben a pozícióban a GATAG-szekvenciát tartalmazza, ami a „kanonikus” GAAAA-szekvenciától 2 nukleotidban is eltér. A GATAG-szekvenciát szinte minden konverziós kísérletünkben érintetlenül hagytuk. Kivételt képeznek a szintetikus oligonukleotidok felhasználásával készült konstrukciók, amelyek a hibás GAGA- és/vagy CCAT-helyeket tartalmazták. Ezeket az oligonukleotidokat ugyanis úgy készítettük el, hogy az említett pozícióban GATAA-helyet hordozzanak. A GATAG/GATAA polimorfizmusokat hordozó legyek fenotípusainak értékelésekor kiderült, hogy ennek az egyetlen kötőhelynek az elrontása önmagában nem eredményez fenotipikus változásokat.

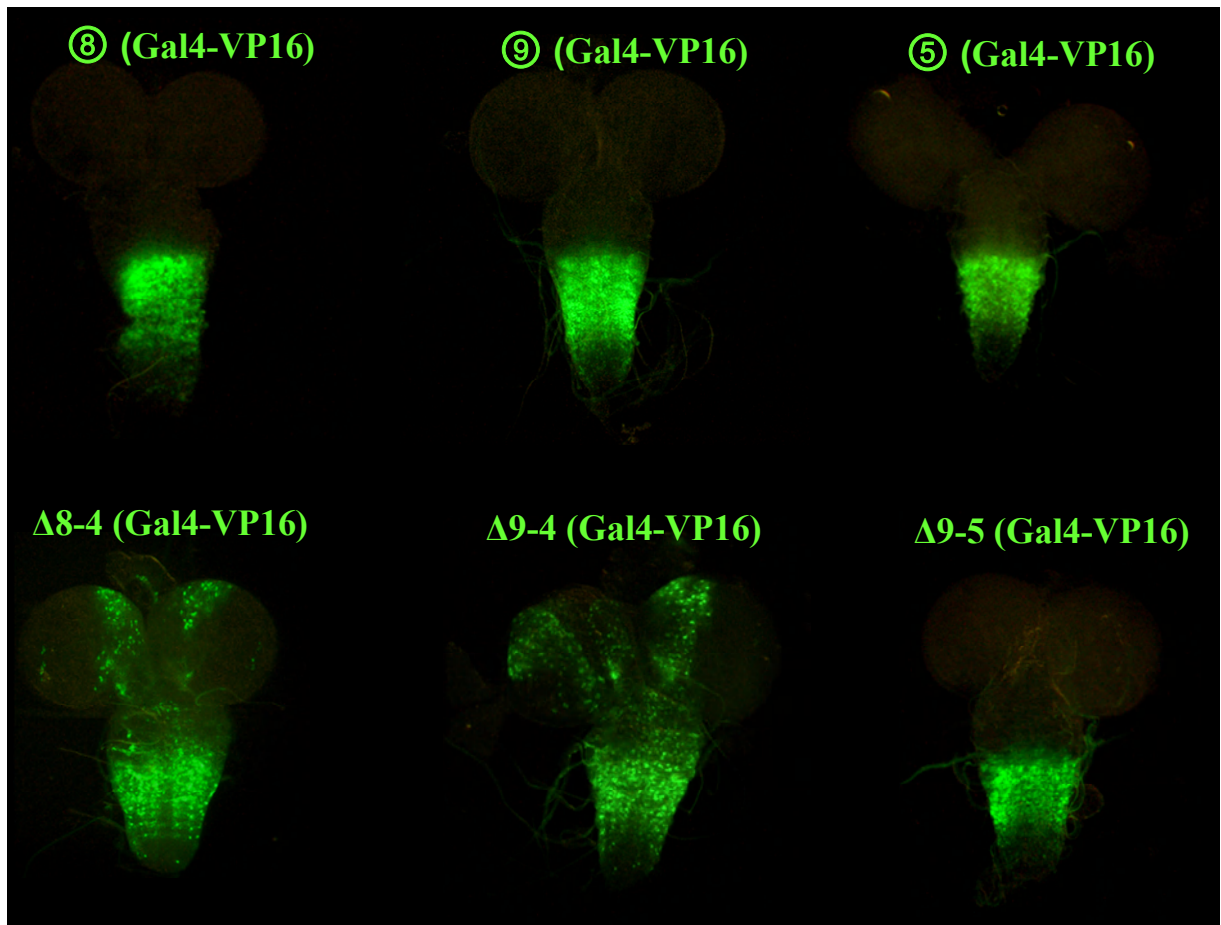
Ezt követően a DSP1-kötőhelyet egyszerre mutáltattuk a PRE-mag GAGA- vagy CCAT-motívumaival. A GAGA- és DSP1-kötőhelymutációkra heterozigóta legyek fenotípusának penetranciája $1,51 \pm 0,11\%$ volt, amely nagyjából megfelel az egyszerű GAGA-hely-mutánsok penetranciájának ($1,84 \pm 0,16\%$) (4. táblázat, 57. oldal). A CCAT- és DSP1-motívumok együttes elrontása heterozigóta formában $5,16 \pm 0,33\%$ -os gyakorisággal okozott poszterior transzformációkat. Noha ez az érték kicsit magasabb, mint csak a CCAT-helyek elrontásakor tapasztalt fenotípus-gyakoriság ($4,06 \pm 0,17\%$), az eltérés statisztikai szempontból éppenhogy szignifikánsnak tekinthető. Az *iab-7* PRE-val végzett transzgenikus kísérletek eredményeivel (Déjardin és mtsai., 2005) ellentétben nem találtunk bizonyítékot arra, hogy a *bxd* PRE magjában

található 1, valamint a tőle disztális irányban elhelyezkedő 228 bp hosszú szakaszon található 4 DSP1-kötőhelynek szignifikáns szerepe lenne a *bxd* PRE működésében.

További kísérletekben tervezzük az egyes *bxd* PRE deléciók és kötőhely-mutációk fenotípusainak *Polycomb* mutáns háttéren történő kvantitatív vizsgálatát. Ezenkívül szeretnénk tovább finomítani a PRE-k szekvencia-követelményeinek és fehérjék általi hozzáférhetőségének meghatározását például olyan DNS-szakaszoknak a *bxd* PRE-mag helyére történő beültetésével, amelyekben a kötőhelyeket egymáshoz képest 5 bp-ral „eltoltuk”, illetve a köztük lévő távolságot megnöveltük.

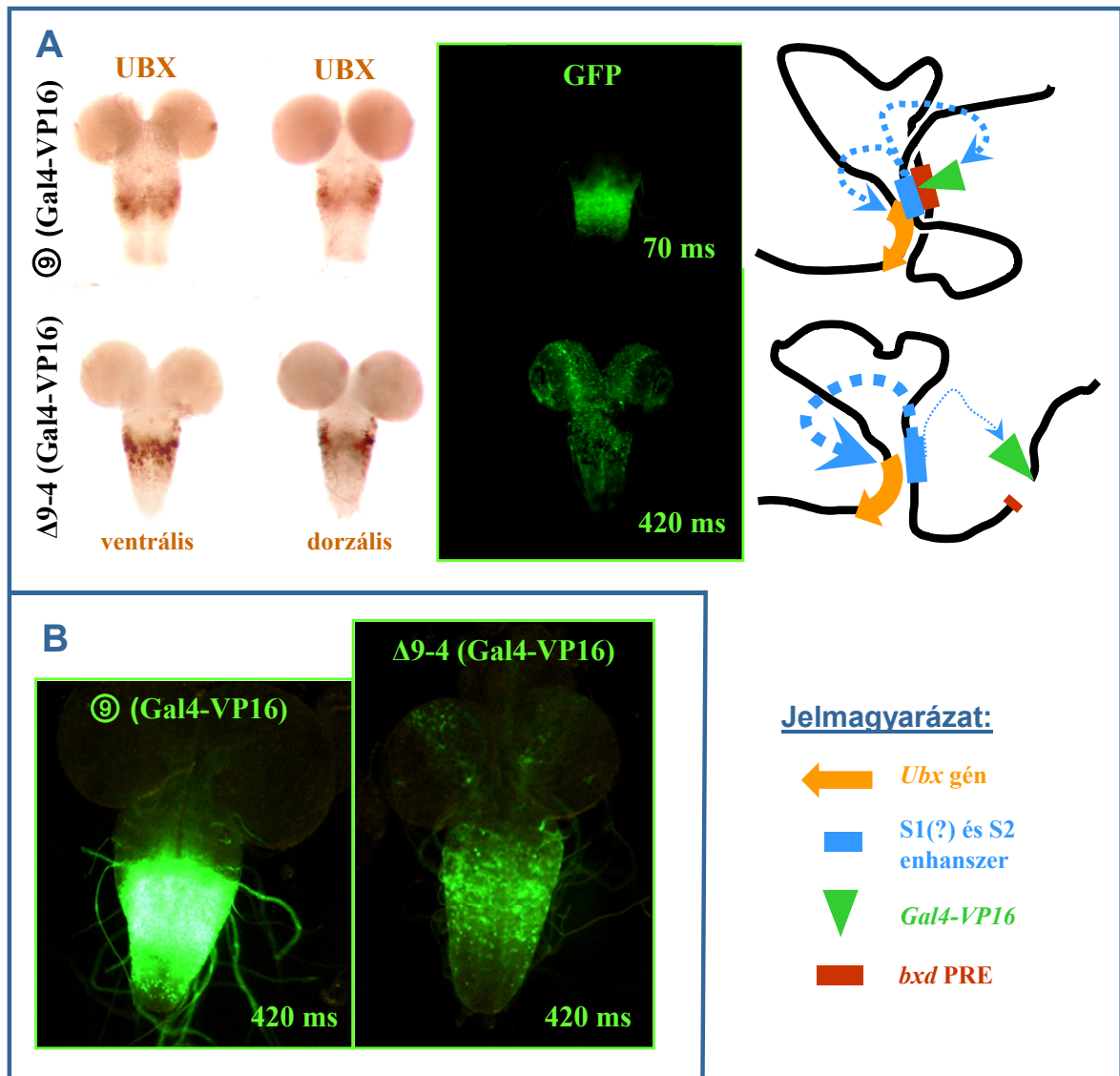
A lokális kromatinszerkezet vizsgálata a *bxd* PRE-ban

A fenotípus-analízissel és az immunhisztokémiai festéssel csupán közvetetten, az *Ubx* gén megváltozott működésén keresztül észleltük azokat a kromatinszerkezeti változásokat, melyeket a *bxd* PRE mutációi okoztak. Hogy közvetlen információt nyerjünk a helyi kromatinszerkezetben bekövetkező változásokról, létrehoztunk egy enhanszercsapdához hasonló módon működő rendszert. Ennek lényege, hogy génkonverzióval előállítottunk olyan kromoszómákat, amelyek a *bxd* PRE bizonyos pozícióiban a *Gal4-VP16* mellett 1 FRT-szekvenciát tartalmaztak, amely segítségével a markergént összekapcsoltuk a korábban létrehozott deléciókkal. A „jelölt” deléciókat hordozó állatokba keresztezéssel bevittük az *UAS-eGFP* gént, így a *Gal4-VP16*-ról termelődő transzkripciós aktivátor az *UAS*-szekvenciákon keresztül indukálta az eGFP fehérje kifejeződését. Az ilyen lárvák központi idegrendszerében vizsgáltuk az eGFP (13. ábra és 14. ábra, 63. oldal) és az *Ubx* (14. ábra, 63. oldal) kifejeződési mintázatát. Azt tapasztaltuk, hogy azok a deléciók, amelyek nem okoztak változást a fenotípusban, nem módosították az eGFP – *bxd* régió által szabályozott – korlátozott kifejeződését sem, hasonlóan a kontroll *Gal4-VP16*-inszerciókhoz (13. ábra). Ezzel szemben a transzformációkat eredményező deléciókat hordozó lárvákban az eGFP-mintázat az elülső testszelvényekbe is kiterjedt (derepresszió). Ugyanezekben a törzsekben az *UBX* is megjelent a PS6-tól előrébb lévő testszelvényekben (14. ábra A, 63. oldal). Tehát a *bxd* PRE esszenciális részének eltávolítása változatlanul *Ubx*-derepressziót eredményezett akkor is, ha a PRE „maradék” részében, a deléció mellett jelen volt a 2,3 kb nagyságú *Gal4-VP16* markergén is. Az eGFP ektopikus kifejeződése pedig hűen tükrözte a *bxd* szabályozó régió derepresszállódását.



13. ábra Az eGFP kifejeződési mintázatából a lokális kromatinszerkezetre következtethetünk. A *bxl* PRE-ba épített *Gal4-VP16* markergén (és az általa aktivált *eGFP*) csak akkor mutatott ektopikus expressziót a lárvális központi idegrendszerben, ha olyan delécio mellé ültettük, amely a felnőtt állatokban is transzformációkat okozott.

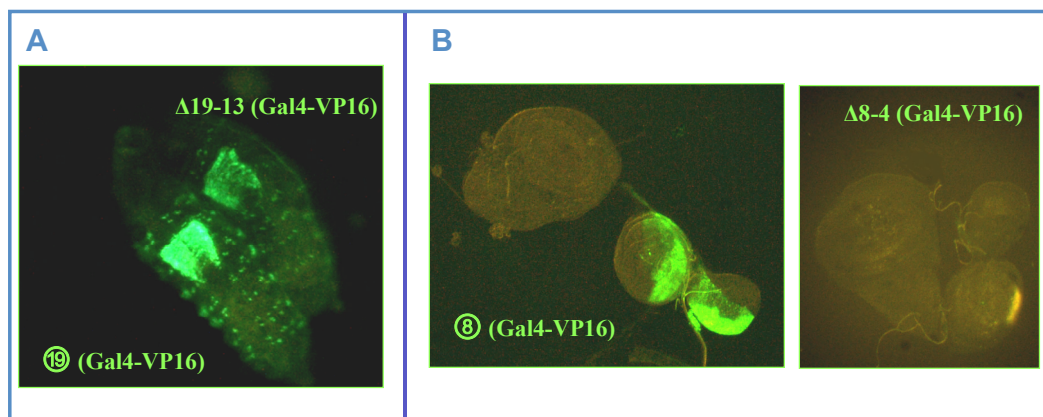
Amikor ugyanazokban az állatokban alaposabban összevetettük az eGFP és az UBX kifejeződését, két lényeges különbséget vettünk észre az expresszió erősségével és mintázatával kapcsolatban (14. ábra A). Egyrészt a deléciós lárvákból származó agyakban az UBX sokkal kevésbé fejeződött ki a PS6-tól előrébb lévő testrészekben, mint az eGFP. Ennek valószínű oka az, hogy az *Ubx* bonyolult, a delécio által nem érintett szabályozási mechanizmusai megakadályozzák a célgén előrébb történő kifejeződését (ld. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA), míg az eGFP mintázata a helyi kromatinszerkezeti viszonyokat tükrözi. Másrészt a deléciós állatokban a csak *Gal4-VP16*-inszerációt hordozó kontroll agyakhoz képest nagymértékben lecsökkent az eGFP kifejeződési szintje (14. ábra B). Ezzel ellentétben az *Ubx*



14. ábra A *bxd* PRE feltételezett kapcsolódása az *Ubx* promóteréhez és enhanszeréhez. **(A)** A *Gal4-VP16* markergén-beépülést [⑨ (Gal4-VP16)] és a marker mellett deléciót [Δ9-4 (Gal4-VP16)] hordozó 3. stádiumos lárvákból származó agyak UBX és GFP kifejeződési mintázata. A GFP-fluoreszcencia dokumentálásánál a könnyebb áttekinthetőség érdekében nem azonos expozíciós időt használtuk. Az ábra jobb oldalán felvázolt modell szemlélteti, milyen kromatinszerkezeti változások állhatnak a kétféle genotípusú állat között tapasztalható különbségek (az UBX és a GFP koncentrációja és eloszlása) háttérében. A szaggatott kék nyilak vastagsága az enhanszerhatás erősségét mutatja. **(B)** A ⑨ (Gal4-VP16) és a Δ9-4 (Gal4-VP16) genotípusú lárvákból származó agyak összehasonlítása azonos beállításonál.

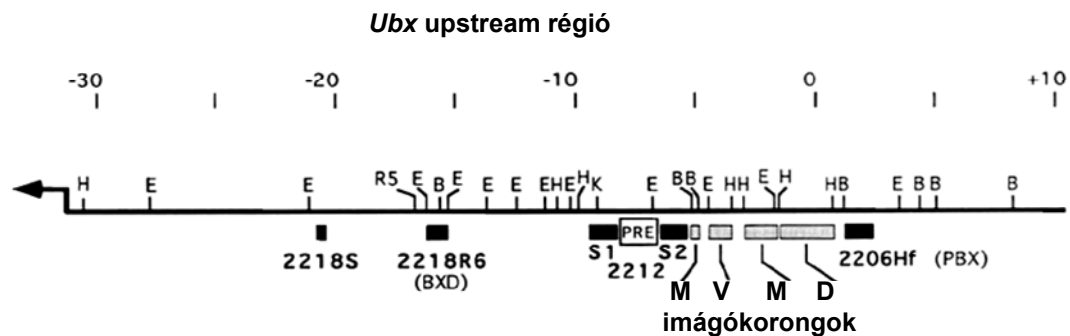
szintje a kontroll állatokban alacsonyabb a deléció lárvákhöz képest. A jelenség magyarázatára felállítottunk egy modellt (14. ábra A). Eszerint a *bx*d PRE *Ubx* promóter - *Ubx* enhanszer - PRE komplexeken keresztül fejti ki szabályozó hatását azokban a szelvényekben is, ahol a *bx*d szabályozó-régió aktív. A komplexek DNS-elemei fehérjéken keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A *bx*d PRE az *Ubx* gén egy vagy több enhanszeréhez is kötődhet. Ha a PRE nincs jelen a kromoszómában, a deléció környéki DNS-szakasz sem tud az *Ubx* promóter - enhanszer komplexhez horgonyzódni. A PRE-deléció mellett lévő *Gal4-VP16* így kevésbé tudja „elszívni” az enhanszerhatás egy részét, ezért az majdnem teljes egészében az *Ubx* kifejeztetésére tud fordítódni. Ezáltal magasabb lesz az *Ubx* és alacsonyabb a *Gal4-VP16* szintje ahhoz képest, amikor a *Gal4-VP16*-inszerció mellett a PRE ép és ezáltal fehérjéken keresztül az *Ubx*-enhanszer komplexhez horgonyzódik. Ez utóbbi esetben a két gén „osztózik” az enhanszer hatásán. A *bx*d PRE helyi kromatinszerkezetére irányuló előzetes kísérleteink rávilágítanak arra, hogy a PRE-k nemcsak azokban a szövetekben kötődnek a promóterhez, ahol feladatuk a célgén represszált állapotban tartása (inaktív domén), hanem ott is, ahol a szabályozott gén kifejeződik (aktív domén). Az enhanszerek helyzete az inaktív doménben egyelőre ismeretlen.

Felmerül a kérdés, hogy a lárvális központi idegrendszerben az összeszerelődött *Ubx* promóter - *Ubx* enhanszer - *bx*d PRE komplex felépítésében vajon mely enhanszer(ek) vesz(nek) részt. Modellünk szerint ha a PRE „horgonyzó” részét deletáljuk, a PRE nem tud az enhanszer - promóter komplexhez megfelelően kapcsolódni, így a PRE-ban levő markergén is „távol marad” az enhanszertől. Ennek következtében jelentős mértékben lecsökken a markergén expressziója. Elvben a *Gal4-VP16* kifejeződéséért felelős enhanszer deléciója is a markergén kifejeződésének csökkenését vagy megszűnését kellene eredményezze. A lokális kromatinszerkezet vizsgálatára irányzott kísérleteink során felfedeztünk egy olyan deléciót, amely csökkent eGFP-szinttel járt együtt (15. ábra A) a lárvális központi idegrendszerben. Ez a deléció ($\Delta 19-13$) eltávolítja az S2 enhanszer egy részét, a PRE esszenciális részét azonban épen hagyja. A *Gal4-VP16* (és ezáltal az eGFP) alacsony szintű kifejeződéséért valószínűleg az S2 enhanszer kromoszómában maradt része felelős. Nem kizárt, hogy az S2 mellett egyéb enhanszerek is részt vesznek a szabályozásban. Egy másik a kísérletben az eGFP kifejeződését vizsgáltuk olyan lárvák imágókorongjaiban, amelyekből eltávolítottuk a PRE-magot ($\Delta 8-4$) (15. ábra B). A $\Delta 8-4$



15. ábra Az eGFP kifejeződésének változása a *bxd* PRE régió különböző részeinek eltávolításakor különböző lárvális szövetekben. (A) Az S2 embrionális enhanszer részleges eltávolítása [$\Delta 19-13$ (Gal4-VP16)] az eGFP-szint csökkenését eredményezi első stádiumos lárvák központi idegrendszerében. (B) A *bxd* PRE-ba ültetett markergén [Ⓢ (Gal4-VP16)] az eGFP-n keresztül az imágókorongokban is tükrözi a *bxd* régió helyi kromatinszerkezetét. Ha azonban eltávolítjuk a PRE esszenciális részét, nem látunk a központi idegrendszerben tapasztalhatóhoz hasonló eGFP-derepressziót. Az eGFP ebben az esetben egyáltalán nem fejeződik ki.

imágókorongokban nem detektálható eGFP-expresszió, míg a kontroll (Ⓢ), ép PRE-t tartalmazó állatok imágókorongjaiban a PS6-ban látható az eGFP. Ezzel szemben, ahogy a 13. ábrán (62. oldal) láttuk, a $\Delta 8-4$ lárvák központi idegrendszerében az eGFP alacsony szinten expresszálódik az agy teljes hosszában. A fentiekből kindulva arra következtetünk, hogy a lárvális agyak esetén a *Gal4-VP16*-expressziót valószínűleg a közeli S2 enhanszer biztosítja döntő mértékben. Noha a *Gal4-VP16* a PRE-mag hiánya miatt a magasabbrendű kromatinszerkezet szintjén nem kapcsolódik az enhanszer - promóter komplexhez, az S2 enhanszer szekvenciaszinten még mindig elég közel lehet a markergénhez ahhoz, hogy biztosítsa annak alacsonyszintű átírását. Az imágókorongokban az S2 enhanszer helyett más, imágókorong-enhanszerek vesznek részt az enhanszer-*Ubx* promóter-*bxd* PRE komplex felépítésében. Az imágókorong-enhanszerek a DNS-szekvenciában távolabb helyezkednek el a PRE-től (16. ábra), ezért ha a *Gal4-VP16* a PRE-val „kiesik” a komplexből, az imágókorong-enhanszerek hatása már nem tud érvényesülni a markergénen. További kísérletekben tervezzük a *bxd* PRE magasabbrendű



16. ábra Az Ubx 5' szabályozó-régiójának térképe (Pirrotta és mtsai., 1995). A promótert a transzkripció irányába mutató nyíl jelzi. A térképpozíciókat kilobázis egységekben tüntettük fel Bender és mtsai. (1983) nyomán. A fekete téglalapok a paraszelveń-specifikus enhanszereket hordozó fragmentumokat jelölik. A szürke téglalapok az imágókorong-enhanszereket mutatják működési helyüknek megfelelő betűkkel ellátva (V: ventrális, D: dorzális, M: minden imágókorongban működő). PRE: *bxd* PRE, S1 és S2: embrionális enhanszerek. A főbb hasítóhelyek: *EcoRI* (E), *HindIII* (H), *BamHI* (B), *EcoRV* (R5), *KpnI* (K).

kromatinszerkezetének részletesebb feltárását az S2 és S1 enhanszer, illetve az *Ubx* promóter szelektív eltávolításával, valamint újabb releváns *bxd* PRE-deléciók és a mutáns PRE-magok *Gal4-VP16*-tal történő megjelölésével.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A P-elem közvetítette génkonverzióban rejlő lehetőségek és a PRE-k *in situ* vizsgálata

Csoportunk kifejlesztett egy új génkonverziós módszert, mellyel célzott módon eltávolítottuk a 3 kb nagyságú *bxd* PRE/TRE régió kisebb darabjait. Kétféle stratégiával alapvetően két típusú deléciót készítettünk: előre meghatározott méretű és pozíciójú; valamint egy általunk megszabott pontból kiinduló, random méretű deléciókat (4. ábra, 39. oldal). A P-elem közvetítette génkonverzió e továbbfejlesztett változata elvileg alkalmas a *Drosophila* genom bármely részének olyan hatékony, célzott megváltoztatására (pl. pontmutációk, kisebb deléciók, kisebb duplikációk létrehozása), melyeknek megvalósítása a korábbi módszerekkel csak nagy fáradsággal vagy egyáltalán nem volt lehetséges. A technika alkalmazhatóságának feltétele, hogy a manipulálni kívánt genomrégióról rendelkezünk szekvenciaadatokkal, a régió közelében legyen legalább egy P-elem-beépülés és rendelkezésre álljon egy, a régiót átfedő deléció. A konverzió során beépülő szelektálható markergén használatával a konvertáns állatok azonosítása egyszerűvé vált, nincs szükség minden egyes olyan kromoszóma PCR technikával történő ellenőrzésére, amelyből a P-elem kivágódott. A létrehozott *in situ* deléciók egymással tetszőlegesen kombinálhatók, ily módon nagyszámú deléciót tudunk létrehozni úgy, hogy kiküszöböljük a technika időben leginkább korlátozó lépéseit: az újabb konverziós konstrukciók készítését és kromoszómába történő beépítésüket. A kromoszómába juttatott ill. a deléciók mellett a kromoszómában maradó FRT-szekvencák közötti rekombináció segítségével nemcsak deléciók hanem duplikációk is egyszerűen létrehozhatók (5. ábra, 40. oldal).

PRE-k *in situ* deléciós vizsgálatával korábban csak egy kutatócsoport foglalkozott. Közleményükben (Mihaly és mtsai., 1997) beszámolnak egy PRE-delécióról, amely 450 bp-t távolít el a BX-C *iab-7* szabályozó-régiójából, közvetlenül a *Frontabdominal-7* (*Fab-7*) szigetelőelem mellől. A legtöbb, erre a delécióra homozigóta állat nem mutatott észrevehető fenotípust. Kivételes esetekben (~2-3%) a 6. potrohszelvény poszterior irányban transzformálódott. A mi *bxd* PRE-magot eltávolító deléciónk (185 bp) még heterozigóta formában is mintegy 10-szer gyakoribb fenotípust eredményez. Lehetséges, hogy az *iab-7* PRE-nak nem egyetlen, hanem több magja van, amelyek vagy „belelőgnak” a *Fab-7* szigetelőelembe vagy disztális irányban terjednek ki az *iab-7* régióba. A 450 bp-os *iab-7* PRE-deléció talán csak részben távolítja el ezeket az elemeket, ez megmagyarázná a nagyon gyenge fenotípust. Egy

másik lehetőség, hogy az *iab-7* PRE egymástól viszonylag távol elhelyezkedő, részben redundáns modulokból épül fel; esetleg együttműködik az *iab-6* és/vagy az *iab-8* régiókkal (Mihaly és mtsai., 2006).

A *bxd* PRE moduláris szerkezete

Ismert, hogy a HOX komplexek funkcionyeréses fenotípusaira gyakran jellemző a penetrancia fokozatos, generációról generációra történő csökkenése. A pontos magyarázatot azonban mégsem tudjuk a *bxd* PRE-deléciókra heterozigóta ill. a $\Delta 17$ esetében heterozigóta és homozigóta állatok fenotípusának visszaszorulására. Lehetséges, hogy más lókuszokban található speciális allélek vagy spontán mutációk dúsulnak fel a deléciós törzseinkben. Másrészt öröklődő epigenetikus változások is bekövetkezhetnek a deléció környezetében található kromatinban. Az bizonyos, hogy a 185 bp-os PRE-mag szomszédságában elhelyezkedő szekvenciáknak kulcsszerepe van a folyamatban, hiszen a $\Delta 17$, a $\Delta 10$ és a $\Delta 1-2$ homozigóta legyek fenotípusai közötti különbség egyértelműen arra utal, hogy a magot határoló szekvenciák jelenléte szükséges a *bxd* PRE működésének fokozatos helyreállításához.

A 185 bp-os deléciónk ($\Delta 17$) jelöli ki azt a legkisebb *bxd* PRE-szakaszt, amelyet el kell távolítani ahhoz, hogy domináns, poszterior irányú transzformációkat kapjunk. Ez a szakasz speciális funkcióval rendelkezik, amelyet legjobb esetben is csak részben képesek a szomszédos szekvenciák helyettesíteni. Azon legyek szelvényei azonban nem transzformáltak, amelyekben a 185 bp-os PRE-magot nem teljesen ejtettük ki ($\Delta 1$, $\Delta 2$ és $\Delta 12$). Ebből az következik, hogy a *bxd* PRE magja önmagában is moduláris felépítésű, az egyes modulok funkciója pedig egymással redundáns. A *bxd* PRE optimális működése tehát szekvenciaszinten többszörösen túlbiztosított. A 185 bp-os mag tartalmazza a főmodulokat, melyek a PRE működésének tekintetében elsőrendű szereppel bírnak, a maggal szomszédos szekvenciák a kiegészítő modulok. A főmodulok – valószínűleg az ép kiegészítő modulokkal együttműködve – képesek egymást helyettesíteni, a kiegészítő modulok pedig képesek részben ellensúlyozni a főmodulok teljes hiányát. A PRE-k moduláris felépítésére korábbi biokémiai adatok is utalnak (Blastyák és mtsai., 2006; Hodgson és mtsai., 2001).

Egy kivétellel ($\Delta 7-13$) minden *bxd* PRE-magot eltávolító deléciónk már heterozigóta formában is poszterior transzformációkat okoz (6. ábra, 42. oldal). A 3 kb-os $\Delta 7-13$ a 16 kb nagyságú *pbx*² delécióra emlékeztet, amely az egyetlen korábban előállított, *bxd* PRE-t eltávolító

internális mutáció. Mind a $\Delta 7-13/+$, mind a $pbx^2/+$ állatok vad fenotípusúak. Az említett deléciók fenotípusaiban észlelt különbségért tehát azok a szekvenciák a felelősek, amelyeket a $\Delta 7-13$ és a pbx^2 deléciók egyaránt eltávolítanak, a kisebb delécióink viszont nem. Például minden olyan deléciónk, amely heterozigóta formában is transzformációt okoz, egyben épségben hagyja azt az 1 kb nagyságú *Sau3A*-fragmentumot, amelyre az S2 embrionális enhanszert lokalizálták (6. ábra, 42. oldal). Valószínű, hogy az S2 embrionális enhanszer ép funkciója szükséges ahhoz, hogy a központi PRE-deléciók hatására az *Ubx* ektopikusan kifejeződjön. A $\Delta 7-13$ deléció azonban kivágja a *Sau3A*-fragmentum felét, és ezzel jó eséllyel eltávolítja az S2 enhanszer egy részét. Erre utal az is, hogy a Gal4-VP16 lényegesen alacsonyabb szinten expresszáldott a $\Delta 19-13$ embriókban és lárvákban, mint a ⑨ számú konvertánsban. A két „csonka”, párosodott S2 enhanszer képes lehet egymást kiegészíteni, hiszen a transzformációk a $\Delta 7-13$ homozigóta legyeken megjelennek. A $\Delta 7-13$ heterozigóta állatok azért nem transzformáltak, mert a balanszer kromoszómán lévő S2 enhanszer nincs ektopikusan derepresszált állapotban, a deléciós kromoszómán található „csonka” párja viszont önmagában nem elegendő az *Ubx* ektopikus kifejeződéséhez. A PRE tehát más típusú szabályozóelemekkel is együttműködhet, így például az S2 enhanszerrel, amely valószínűleg szintén moduláris felépítésű.

A PRE-k együttműködése

A 450 bp-os *iab-7* PRE-delécióval ellentétben a mi 665 bp-os $\Delta 1-2$ deléciónk úgy tűnik, eltávolít minden PRE-funkcióval rendelkező szakaszt a *bxd* szabályozó-régióból. Erre utal az erős fenotípus és a $\Delta 1-2$ homozigóta legyek közel 100%-os, stabil penetranciája. Nem tudjuk azonban, a deléciós legyek megfelelő szelvényei miért változó mértékben, olykor csak részlegesen transzformáltak. Lehetséges, hogy a deléciókra heterozigóta legyek esetén a vad típusú homológ kromoszómán található *bxd* PRE különböző mértékben képes kompenzálni a hiányzó *bxd* PRE-t. Ilyen, homológ kromoszómákon lévő PRE-k szerepére utal az a megfigyelésünk, hogy a hemizigóta $\Delta 1-2$ fenotípusa súlyosabb a heterozigótáénál. Ezt részben alátámasztja az a megfigyelés, mely szerint a $\Delta 1-2$ heterozigóta legyek nagyobb arányban és nagyobb mértékben voltak transzformáltak *Polycomb* heterozigóta háttéren.

Nem vártuk, hogy az *in situ bxd* PRE-deléciók által okozott szelvénytranszformációk kevés kivételtől eltekintve kizárólag az 5. paraszelvényt (PS5) fogják érinteni. Az *Ubx*

átíródásának gátlása az előrébb lévő testrészekben a *bithorax* régióban azonosított PRE-n keresztül valósulhat meg. A szárny elülső részében (PS4) és az 1. potrohszelvény tergijén (PS6) elvértve megjelenő funkcionyeréses fenotípus azt jelzi, hogy a vad típusú legyekben a *bxd* PRE együttműködik a szomszédos szabályozó-régiókban található PRE-kkal. E kölcsönhatásokat megszüntető kromoszomális átrendeződések lehetnek felelősek az ún. „cis-overexpression” (COE) hatásért (összefoglalva Lewis, 1998). Egy olyan kromoszóma elkészítése, amelyből egyszerre hiányzik a *bithorax* és a *bxd* PRE, választ adhatna ezekre a kérdésekre.

A TRE-k és PRE-k szerepe eredeti kromoszomális környezetükben

A transzgenikus kísérletek eredményei alapján egy adott szabályozó-régióban található TRE-k eltávolításakor azt várnánk, hogy a szabályozott gén kifejeződése csökkenjen. Esetünkben a $\Delta 7-13$ kivágja mindhárom irodalmi adatokból ismert TRE-t a *bxd* régióból, azonban erre a 3 kb-os delécióra homozigóta embriókban és lárvákban mégsem tapasztalható alacsonyabb *Ubx* kifejeződési szint. Ennek megfelelően a lárvákon és a felnőtt legyeken sem észleltük például a billérek szárnyá, a 3. láb 2. lábba vagy az 1. potrohszelvény torsiárányá történő transzformációját. Az ilyen állatok tehát nem mutattak anterior irányú transzformációt, amely a BX-C funkcióvesztéses mutációjának felelt volna meg. Nincs tehát bizonyítékunk arra, hogy a PRE/TRE-k *in situ* – a represszió mellett – a célgén aktivációjához is szükségesek. Természetesen az is lehetséges, hogy azért nem kaptunk anterior transzformációkat, mert a $\Delta 7-13$ által eltávolított TRE-kon kívül más aktivációs helyek is vannak a szabályozó-régióban, melyek teljes mértékben helyettesíteni tudják a kiejtett TRE-k funkcióját. Egy másik magyarázat szerint viszont a TRE-k egyetlen szerepe az, hogy gátolják a PcG fehérjék inaktiváló hatását azokban a szelvényekben, ahol a *bxd* régió aktív. Más csoportok eredményei alapján is megszületett az a feltételezés, hogy a TRE-kon keresztül ható TrxG fehérjék nem aktivátorként, hanem sokkal inkább antirepresszorként működnek (Klymenko és Müller, 2004).

Eredményeinket sokkal nehezebb összeegyeztetni azzal a közleménnyel, amely arról számol be, hogy a TRE-transzkriptumok szükségesek az *Ubx* aktivációjához. A szerzők szerint ha ezeket a transzkriptumokat RNS-interferencia segítségével elimináljuk a sejtekből, ez az *Ubx* csendesítését eredményezi a szárnyban és a lábdiszkuszokban (Sanchez-Elsner és mtsai., 2006). A $\Delta 7-13$ deléció eltávolítja mindhárom TRE-transzkriptum DNS-templátját, amelyekről ily módon eleve nem is képződnek RNS-másolatok. Ezenkívül a templátoknak nincsenek

homológjai a genom más részein, amelyekről működőképes transzkriptumok képződhetnének. Mindezek ellenére a $\Delta 7-13$ deléciós állatokban nem csökken az *Ubx* kifejeződési szintje, és mintázata sem szorul vissza. Úgy gondoljuk, a TRE-transzkripció valószínűleg a PRE PS6-ban történő „kikapcsolásához” szükséges, hasonlóan a régió nagyobb nem kódoló RNS-eihez (Schmitt és mtsai., 2005). A TRE-transzkriptumok azonban nem lehetnek felelősek a fentebb említett *Ubx*-aktiváló transz hatásért (Sanchez-Elsner és mtsai., 2006). Bármilyen is legyen a TRE-k pontos szerepe, eredményeink arról tanúskodnak, hogy az általunk vizsgált 3 kb-os régióban található PRE/TRE-k egyszerre történő eltávolítása az *Ubx* gén derepresszióját, és nem inaktivációját eredményezi.

Útban a PRE-k finomszerkezetének megértése felé

Továbbfejlesztett génkonverziós technikánk lehetővé tette, hogy megvizsgáljuk, hogyan működnek a *bxd* PRE-mag különböző változatai az eredeti kromoszomális környezetben. A *bxd* PRE-magot más PRE-kkal is helyettesíteni tudtuk. Stratégiánk szerint a konvertáns állatokban éppen hagytuk a vad típusú *bxd* PRE-magot, így ezen állatok szelvényei nem tértek el a normálistól. A vad típusú PRE-szekvenciát csak a következő lépésben távolítottuk el, így megvizsgálhattuk a mutáns PRE megmaradt funkcióját. Módszerünk azon tulajdonsága, mely szerint többször újra létre tudtuk hozni az egyes deléciókat, előfeltétele volt az általuk okozott fenotípusok kvantitatív kiértékelésének, hiszen a fenotípusok erőssége és penetranciája generációról generációra gyengült mind a homozigóta, mind a heterozigóta törzsekben.

A *bxd* és az *iab-7* PRE-kban található CCAT- és GAGA-kötőhelyek mintázata között erőteljes hasonlóság fedezhető fel. Emiatt talán nem meglepő, hogy az említett kötőhelyeket tartalmazó 191 bp-os *iab-7*-fragmentum – orientációra való tekintet nélkül – teljes mértékben képes helyettesíteni a 185 bp-os *bxd* PRE-magot. Erre a kicserélt PRE-ra homozigóta vagy heterozigóta legyek nem mutatnak sem poszterior, sem anterior irányú transzformációkat, ami azt jelenti, hogy a PRE-k nem hordoznak pozicionális információt. Vagyis a PRE-kba nincsen „belekódolva”, hogy melyik szelvényben kell korlátozniuk a célgén kifejeződését, tehát egyszerű „silencer”-ekként működnek. Ezen eredmények megerősítik a korábbi transzgenikus kísérletek következtetéseit, amelyekben a jelenség vizsgálatára nagyobb PRE-fragmentumokat fuzionáltattak különböző enhanszerekkel (Chiang és mtsai., 1995; Simon és mtsai., 1993). Ugyanakkor a 189 bp nagyságú *iab-5*-fragmentum is tökéletesen helyettesíti a hiányzó *bxd* PRE-

mag funkcióját annak ellenére, hogy kötőhely-mintázata sokkal kisebb hasonlóságot mutat. Ez megnehezíti a PRE-k szekvenciakövetelményeinek meghatározását, másrészt viszont hangsúlyozza a GAGA- és CCAT-motívumot jelenlétének fontosságát. További kutatásainknak irányvonalat adhat azonban, hogy az emberből származó 263 bp-os H1 és 222 bp-os H2 szakasz egyáltalán nem képes helyettesíteni a vizsgált szabályozóelem magját. Ez nagy valószínűséggel kizárja a lehetőséget, mely szerint a 185 bp-os *bxd* PRE-szakasznak csupán távtartó szerepe van. Az egyértelműen PRE-funkció nélküli H2 szakasz még gátolja is a *bxd* PRE megmaradt gyenge aktivitását. Felmerül a kérdés, hogy a H1 miért nem képes PRE-ként működni. Lehetséges, hogy a H1 a szükségesnél eggyel kevesebb CCAT-hellyel rendelkezik, a *bxd*, *iab-5*, *iab-7*-fragmentumokban ugyanis legalább 4 példányban megtalálható ez a kötőhely. Egy további lehetőség az, hogy a humán DNS-szakaszban talán túl messze helyezkednek el egymástól a CCAT- és GAGA-motívumok. Amellett, hogy az egyes kötőhelyek közötti „távtartó” szakaszok lehetnek túl hosszúak, bizonyos kötőhelyek között lehetnek akár túl rövidek, vagy nem megfelelő összetételűek is, emiatt a fehérjék nem tudják felépíteni a csendesítéshez szükséges PcG-komplexeket. Természetesen más, eddig ismeretlen fehérje-kötőhelyeknek is fontos szerepe lehet a PRE-k felépítésében. Elképzelhető, hogy a fenti lehetséges feltételek közül akár többnek is teljesülnie kell ahhoz, hogy egy adott DNS-szakasz PRE-ként tudjon működni.

A két szekvenciaspecifikus DNS-kötő képességgel rendelkező PcG fehérje, a PHO és a PHOL konszenzus kötőhelyének tekintetében az irodalmi adatokban sincs mindig egyetértés (Fritsch és mtsai., 1999; Mahmoudi és mtsai., 2003; Mihaly és mtsai., 1998). Kísérleteinkben arra törekedtünk, hogy a korábbi irodalmi adatokból kiindulva minden potenciális PHO/PHOL-kötőhelyet „célbavegyünk”, ezért a CCAT-szekvenciákat tekintettük a két fehérje kötőhelyének. A 185 bp-os *bxd* PRE-mag első 2 CCAT-motívumát egyetlen bázis választja el egymástól (II. ábra A, 53. oldal). Ennek az elrendezésnek fontos szerepe lehet a PRE-k felépítése szempontjából, hiszen az *iab-7* PRE-ban kétszer is megtalálhatók hasonló kötőhelypárok (Mihaly és mtsai., 1998). Igaz, az általunk tesztelt *iab-7* PRE-szakasz egy ilyen kötőhelypárt tartalmazott, mégis teljes mértékben helyettesíteni tudta a *bxd* PRE magját. Ha mind az 5 CCAT-helyet elrontottuk a *bxd* PRE-magban, ez egy alacsony penetranciájú funkciónyeréses fenotípus megjelenését eredményezte, ami önmagában arra utalna, hogy e kötőhelyeknek nincs nagy jelentősége a PRE működése szempontjából. Kimutattuk azonban, hogy – a magban található GAGA-szekvenciákon kívül – a maggal szomszédos DNS-szakaszok is képesek részben ellátni a

„kiesett” CCAT-helyek feladatát is. A CCAT-helyek pontmutációi így is legalább kétszer gyakrabban okoznak funkcióneréses fenotípust az őket hordozó állatokban, mint a GAGA-helyek pontmutációi. Ez a különbség még kifejezettebbé válik (6,5-szörös), ha a disztális irányban elhelyezkedő, szomszédos 228 bp is hiányzik a kromoszómából. Eredményeink jól összeegyeztethetőek egy 567 bp-os *bxd* PRE-szakaszt vizsgáló transzgenikus tanulmánnyal, mely szerint a GAGA-helyek elrontása nincs hatással a riportergén kifejeződésére imágókorongokban (Brown és mtsai., 2003). Kísérleteinkből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a CCAT-kötőhelyek legalábbis bizonyos PRE-k esszenciális alkotóelemei; ezt a *bxd* PRE szerkezetére jellemző nagyfokú redundancia ellenére is igazolni tudtuk. Lehetséges, hogy más PRE-k esetén egyéb kötőhelyeknek (pl. GAGA) van nagyobb jelentősége, ahogy ezt a 138 bp-os *iab-5* PRE-fragmentumról transzgenikus tesztekben ki is mutatták (Busturia és mtsai., 2001).

Több fehérjéről is bizonyították, hogy kötődnek a (GA)_n-ismétlődésekhez. Ezek közül a GAGA és a PSQ a legismertebb. A GAF N-terminális BTB/POZ doménjén keresztül homooligomereket képez, ezáltal nagyobb affinitással kötődik olyan DNS-szakaszokhoz, ahol kötőhelye több kópiában megtalálható (Katsani és mtsai., 1999). Ugyanakkor a GAF-ról kimutatták, hogy a GAG-tripletekhez is majdnem olyan affinitással kötődik, mint a GAGAG-pentamerekhez (Wilkins és Lis, 1998). Ebből kindulva az irodalomban általánosan elfogadott pentamerek helyett a GAGA-tetramereket mutáltattuk. Annak ellenére, hogy más csoportok nagyon fontos szerepet tulajdonítanak a (GA)_n-ismétlődéseknek a géncsendesítésben, a mi kísérleteink alapján a GAGA-helyek elrontása önmagában nagyon gyenge hatással jár. Ez még akkor is így van, ha a disztális irányban lévő szomszédos 228 bp-t eltávolítjuk. Lehetséges azonban, hogy a PRE-magtól proximális irányban elhelyezkedő DNS-szakaszok is kompenzálni képesek a magban létrehozott pontmutációkat. A transzgenikus kísérletek között (Hodgson és mtsai., 2001) valóban találunk erre utaló bizonyítékot, ugyanis ez a kb. 200 bp hosszú proximális szakasz tartalmaz egy 70 bp-os, (GA)₃-ismétlődésekkel tűzdelt fragmentumot (MHS-70), amely fontos szerepet játszott a riportergén csendesítésében. Gél retardációs (gel shift) kísérletben bizonyították továbbá, hogy a *bxd* PRE-magban található kb. 20 bp-os GA-ismétlődés erősen kompetál az MHS-70-nel, vagyis a két fragmentum ugyanazokat a fehérjéket köti.

Noha a *bxd* PRE magjában található CCAT- és GAGA-kötőhelyek külön-külön történő mutáltatása viszonylag gyenge fenotipikus következményekkel jár, a kétféle motívum együttes elrontása teljes mértékben működésképtelenné teszi a PRE-magot, hiszen funkcióneréses

fenotípusának penetranciája megegyezik a teljes PRE-mag deléciója által okozott fenotípus-
gyakorisággal. Eredményeink arra utalnak, hogy a kétféle kötőhelyhez kapcsolódó
fehérjefaktorok között nagyfokú kooperativitás van. Biokémiai kísérletekben is bizonyították,
hogy a GAF elősegíti a PHO kromatinhoz történő kötődését (Mahmoudi és mtsai., 2003). A
folyamatban valószínűleg együttműködik a NURF fehérjével, amellyel nukleoszóma-mentes,
DNáz-hiperszenzitív helyeket alakítanak ki (Lu és mtsai., 1993). Az *iab-5*, *iab-7* és a *bxg* PRE-
 régióban is valóban találtak DNáz-hiperszenzitív helyeket (Dellino és mtsai., 2002; Karch és
 mtsai., 1994; Mishra és mtsai., 2001). Továbbá az *iab-5* és *iab-7* PRE-k csendesítő képességéhez
 transzgenikus tesztekben is szükség volt a PHO- és GAGA-kötőhelyek jelenlétére (Busturia és
 mtsai., 2001; Mishra és mtsai., 2001). Ezen korábbi vizsgálatok a PRE-aktivitással rendelkező
 legkisebb szakaszokat az *iab-5* esetében 138 bp-ra, az *iab-7* esetében pedig 230 bp-ra
 térképezték. A két PRE-fragmentum, amelyet a *bxg* PRE-mag helyettesítésére használtunk, jó
 átfedést mutatott a transzgenikus tesztekben definiált minimális PRE-kkal.

Annak ellenére, hogy a CCAT- és GAGA-motívumok együttes elrontása
 működésképtelenné teszi a *bxg* PRE-magot, ennek ellenére lehetnek más fehérje-kötőhelyek is,
 amelyek szükségesek a PRE által közvetített géncsengesítéshez. Például a HMG (high mobility
 group) fehérjék közé tartozó DSP1 – amelyről korábban úgy tartották, hogy szekvenciaspecifitás
 nélkül kötődik a DNS kisarkában (Thomas és Travers, 2001) – újabb irodalmi adatok szerint a
 több PRE-ban is megtalálható GAAAA-motívumhoz kapcsolódik (Déjardin és mtsai., 2005).
 Kísérleteink szerint a PRE-magban található egyetlen GATAA-motívum (a DSP1-kötőhely egy
 feltételezett variánsa) elrontása nem jár számottevő fenotipikus következményekkel. Még ha a
 hibás GAGA-helyeket tartalmazó PRE-mag mellől eltávolítottunk a szomszédos 228 bp-t, és
 ezzel együtt még 4 lehetséges DSP1-motívumot, akkor is csak nagyon gyenge funkcionyeréses
 fenotípust tapasztaltunk. Úgy tűnik tehát, hogy a vélelmezett DSP1-kötőhelyeknek nincs vagy
 csak nagyon kicsi szerepe van *in situ* e sokat tanulmányozott PRE működésében.

In situ kísérleteinkben kimutattuk, hogy a *bxg* PRE-mag kicserélhető két másik BX-C-
 ben található PRE-ra anélkül, hogy ez zavart okozna a komplexben található génnek
 szabályozásában. A *bxg* PRE magjában elhelyezkedő CCAT- és GAGA-motívumok egymással
 együttműködnek, és – GA(A/T)AA-kötőhelyekkel ellentétben – elengedhetetlenül szükségesek a
 géncsengesítő működéshez. Kifinomult génkonverziós módszerünk felhasználható arra, hogy
 még részletesebben megvizsgáljuk a PRE-k felépítését és megállapítsuk a szekvencia-

kritériumait. Változtathatjuk például a GAGA- és CCAT-kötőhelyek számát, egymáshoz viszonyított elrendezésüket vagy a köztük lévő „távtartó” nukleotidok számát. Tanulmányozhatjuk, hogy a „távtartó” szakaszoknak van-e valami egyéb szerepe is. Ezenkívül tesztelhetünk más, számítógépes elemzéssel vagy egyéb módon azonosított *Drosophila* PRE-kat, illetve más organizmusokból származó potenciális PRE-kat arra a tulajdonságukra, hogy képesek-e az *Ubx* gén kifejeződési mintázatát megfelelően fenntartani. Reményeink szerint kísérleteink elvezethetnek akár működőképes „mesterséges” PRE-k összeszereléséhez, illetve elősegíthetik a magasabbrendű élőlényekben található *Hox* komplexek kromatinszerkezeti szabályozásának megismerését is.

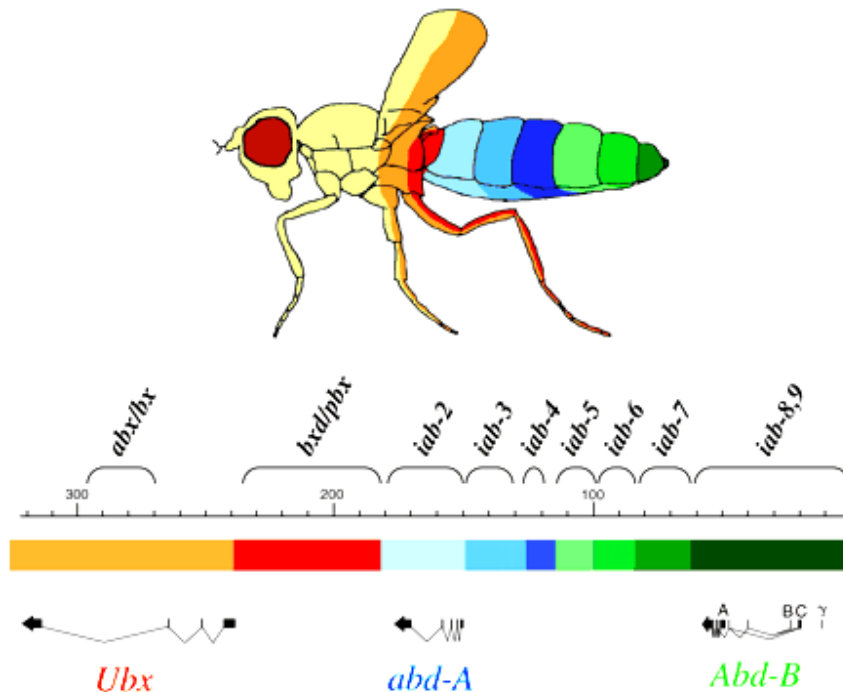
FÜGGELÉK

A bithorax komplex (BX-C) működése

A genomprojektek arra a meglepő következtetésre jutottak, hogy a szövetes állatok DNS-ének csak egy kicsiny része kódol funkcionális fehérjéket. Számos kutatási program vizsgálja a genom maradék részének szerepét. A *Drosophila* 300 kb nagyságú BX-C-je az egyik olyan genomrégió, amely a nem-kódoló DNS-ről szóló új információk gazdag tárházaként szolgál. A BX-C-ről kezdetben kizárólag genetikai adatok álltak rendelkezésünkre, amelyek a komplex bonyolult fenotípusait és azok közötti kölcsönhatásokat írták le. Ed Lewis 40 év úttörő munkáját foglalta össze 1978-as közleményében, melyben áttekintette azt a mutációs sort (*abx/bx*, *bxd/pbx*, *iab-2*, ... *iab-8*), amely az állat testének hátsó kétharmadát – a 3. torsiálszelvényt (T3) és a 8 potrohszelvényt (A1-A8) – érinti (Lewis, 1978) (17. ábra). A további fenotípus-analízis megállapította, hogy a 9 mutációcsoport mindegyike egy-egy „elemet” határoz meg, amelyek egy-egy megfelelő szelvény identitásáért felelősek (Karch és mtsai., 1985). Érdekes módon ezek a mutációk olyan sorrendben térképeződtek a kromoszómára, amely megfelel az általuk meghatározott testtájak testtengely menti sorrendjének. Ez a kolineáris elrendeződés evolúciósan konzerválódott a legtöbb állatban (McGinnis és Krumlauf, 1992).

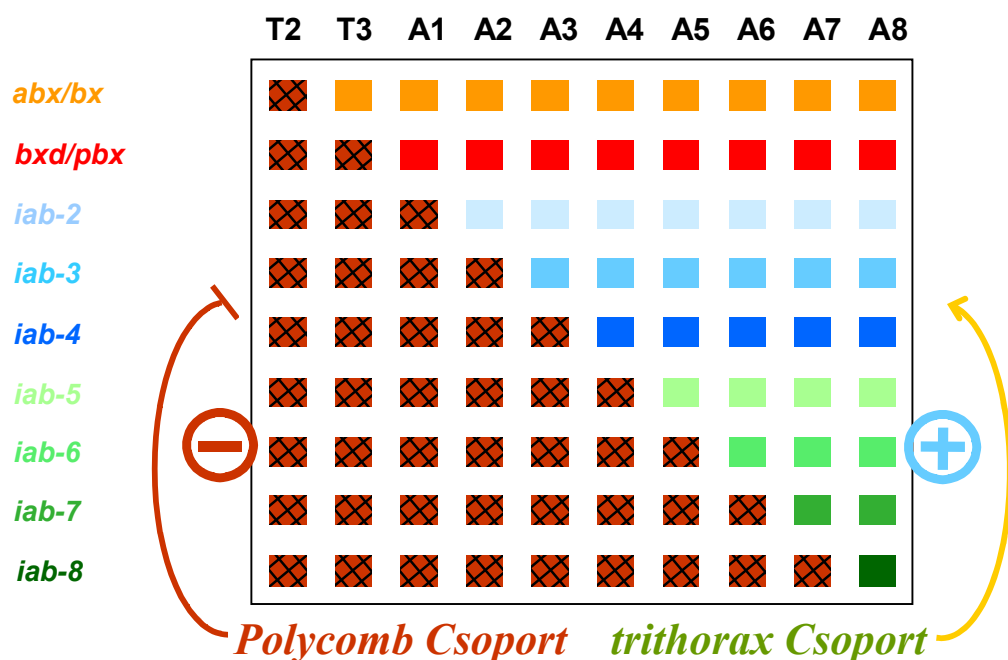
Habár az egész BX-C-re deléciós embriók sohasem alakulnak lárvává, megállapítható róluk, hogy a 2. torsiálszelvénytől (T2) hátrébb elhelyezkedő szelvények mindegyike T2-vé fejlődik. Emiatt Ed Lewis úgy gondolta, a T2 jelenti a fejlődés alapállapotát, és minden mutációcsoport megfelel egy szelvényt-specifikus funkciónak, amely lehetővé teszi a poszterior irányban lévő szelvények számára, hogy az alapállapothoz képest továbbfejlődjenek. Ezenkívül minden szelvényt-specifikus funkciót érintő mutáció hatására az adott testszelvény a legutolsó „érintetlen” – vagyis egy szelvénnel előrébb elhelyezkedő – szelvénné transzformálódik, ezért minden funkciónak, ami szükséges az előrébb lévő testszelvények kialakításához, jelen kell lennie a hátrébb lévő testszelvényekben is. Vagyis a szelvényt-specifikus funkciók additív módon hatnak. A *bxd/pbx* funkcióra mutáns állatok A1 szelvénye például extra T3 szelvénné fejlődik, tehát a *bxd/pbx* normális szerepe az A1 szelvény kialakítása, és a T3 szelvényt kialakító *abx/bx* funkciónak jelen kell lennie a vad típusú A1 szelvényben is. Ezeket a megfigyeléseket Lewis két szabályban foglalta össze: (1.) „egy adott szelvényben derepresszáldott [szelvényt-specifikus funkció] minden hátrébb elhelyezkedő szelvényben is derepresszálván marad”, és (2.) „minél

hátrébb helyezkedik el egy adott testszelvény, annál több a derepresszáladott [szelvényt specifikus funkció] benne” (Lewis, 1978).



17. ábra A BX-C felépítése (Maeda és Karch, 2006). A színes téglalapok a BX-C DNS-ét jelentik. A térképkoordináták megadása az eredeti *Drosophila* Genomprojekt szekvenciaadatai alapján történt (Martin és mtsai., 1995). A BX-C-ben található 3 homeotikus gént (*Ubx*, *abd-A*, *Abd-B*) a DNS alatt elhelyezett horizontális fekete téglalapok (exonok) és az azokat összekötő diagonális vonalak (intronok) jelzik. Egy adott színnel jelzett gén cisz-regulátor doménjeit ugyanazon szín különböző árnyalatai jelölik. Az egyes cisz-regulátorokban bekövetkezett mutációk által érintett szelvények pedig a megfelelő doménnel kaptak azonos színjelzést.

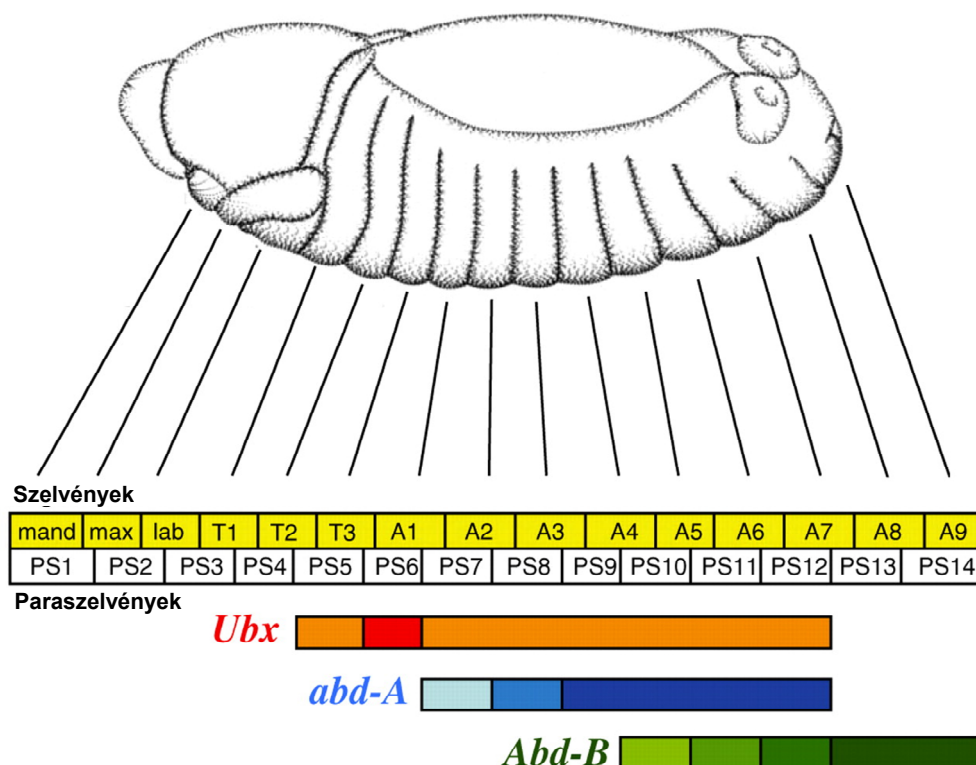
1985-ben két csoport egymástól függetlenül végezte el a BX-C első valódi komplementációs analízisét, mely szerint a BX-C-ben mindössze 3 homeotikus gén található: az *Ultrabithorax* (*Ubx*), az *abdominal-A* (*abd-A*) és az *Abdominal-B* (*Abd-B*) (Sánchez-Herrero és mtsai., 1985; Tiong és mtsai., 1985) (17. ábra). Ezt megerősítette a BX-C teljes szekvenciájának megjelenése (Martin és mtsai., 1995). Ezt követően különböző mutáns embriókban vizsgálták a 3 homeotikus gén kifejeződési mintázatát, így világossá vált, hogy a 9 szelvényt specifikus funkció 9 cisz-regulátor régióval felel meg, amelyek a 3 homeotikus gén finoman szabályozott, paraszselvényenként (PS) különböző kifejeződési mintázatának kialakításáért felelősek (összefoglalva Maeda és Karch, 2006) (18-19. ábra). Az *abx/bx* cisz-regulátor a PS5-ben, a



18. ábra A BX-C cisz-regulátor doménjeinek aktivitási mintázata a különböző testszelvényekben. Az első cisz-regulátor domén (*abx/bx*) a T3/PS5-ben az aktiválódik, és a T3-tól hátrébb elhelyezkedő testszelvényekben is aktív marad. Hasonlóan, az állat AP testtengelye mentén hátrafelé haladva minden testszelvényben egy-egy újabb regulátor régió válik aktívvá. Az inaktív állapotot a PcG fehérjék tartják fenn az adott a cisz-regulátorban található PRE-hoz kötődve, az aktív állapotot pedig a PRE-val szomszédos TRE-n ható TrxG fehérjék stabilizálják.

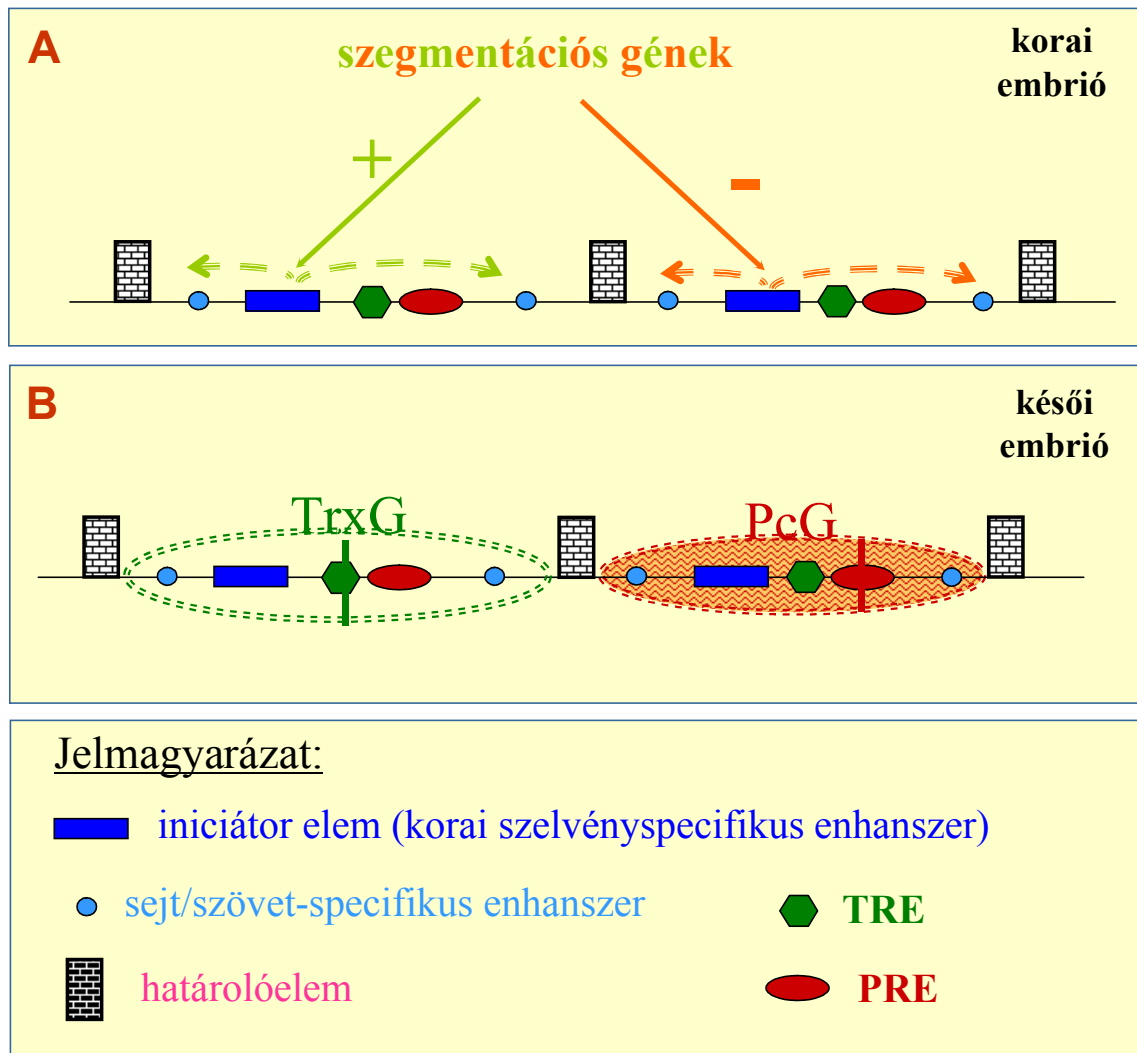
bxd/pbx a PS6-ban szabályozza az *Ubx* gén kifejeződését. Hasonlóan, az *iab-2*, *iab-3* és *iab-4* a megfelelő *abd-A* kifejeződési mintázatot biztosítják a PS7, PS8 és PS9-ben. Az *Abd-B* kifejeződésének szabályozása bonyolultabb a másik két génénél, ugyanis 4 különböző transzkriptum íródik át róla. A PS10-13-at kialakító *Abd-B^m* transzkriptumot az *iab-5*, *iab-6* és *iab-7* régiók szabályozzák.

A *Drosophila* egyedfejlődés korai stádiumaiban a szegmentációs (gap és pair-rule) gének által kódolt transzkripciós faktorok osztják fel az embriót 14 paraszelvénnyre az anterior-posterior (AP) tengely mentén (összefoglalva Maeda és Karch, 2006). Ezek a fehérjék kölcsönhatnak az egyes cisz-regulátor régiókban megtalálható iniciátor elemekkel (20. ábra A, 80. oldal). Például a PS12-ben jelen lévő gap és pair-rule géntermékek kombinációja az *iab-7* régió számára teszi lehetővé, hogy a PS12/A7-ben szabályozza az *Abd-B* kifejeződését, az *iab-8* számára nem. A BX-C-ben található iniciátor elemeket olyan speciális enhanszereként definiálhatjuk, amelyek a riportergének paraszelvények szerint korlátozott kifejeződési



19. ábra Szelvények, paraszelvények és a BX-C homeotikus génjeinek kifejeződési mintázata (Maeda és Karch, 2006). A korai embriogenezis során a *Drosophila* embrió a maternális, gap és pair-rule géntermékek hatására 14 paraszelvényre (PS) tagolódik. A felnőtt állat 3 feji, 3 tor- és 8 potrohszelvénye ebből a 14 PS-ből fejlődik ki. Habár a szelvények és PS-ek száma hasonló, egymáshoz képest kissé eltolódva találjuk meg őket. A torra és a potrohra jellemző, hogy egy PS egy szelvény hátsó egyharmada és a következő szelvény első kétharmada által kijelölt területnek felel meg. Ez az eltolódás a felnőtt állaton nem feltűnő, mert a potrohszelvényeknek csak az elülső része látható, emiatt szokás például a 6. potrohszelvényt a PS11-nek megfeleltetni. A BX-C homeotikus génjei PS-ek – és nem szelvények – szerint szabályozódnak (a sötétebb színárnyalatok magasabb kifejeződési szintet jelölnek).

mintázatát képesek kialakítani a korai embriogenezis során. Mivel a gap és pair-rule gének átíródása átmeneti, a szelvényt specifikus cisz-regulátor régiók állapota viszont a légy teljes élete során stabil marad, szükség van egy fenntartó rendszerre minden cisz-regulátor régióban a homeotikus génexpresszió folyamatos biztosítására. Erről a fenntartó rendszerről kimutatták, hogy működéséhez szükség van a *Polycomb* (*Pc-G*) és a *trithorax csoport* (*trx-G*) génjeinek termékeire (18. ábra, 78. oldal és 20. ábra B). A *Pc-G* fehérjék negatív módon szabályoznak: a Polycomb Response Element-ekhez (PRE) kötődve tartják inaktív állapotban a nem működő



20. ábra A cisz-regulátor régiókat felépítő szekvenciaelemek vázlatos áttekintése (A és B), és a szabályozó-régiók kétlépcsős működése a korai (A) és késői (B) embriogenezis során. Magyarázat a szövegben.

cisz-regulátor régiókat. Ezzel szemben a Trx-G fehérjék pozitív módon szabályoznak: a PRE-k szomszédságában elhelyezkedő Trithorax Response Element-ekhez (TRE) kötődve aktív állapotban tartják a működő szabályozó régiókat. Egy iniciátor elemmel együtt egy PRE/TRE az embriogenezis és a lárvális élet során is végig fenntartja a riportergén kifejeződését az iniciátor elem által kijelölt szelvényben és attól hátrafelé (attól anterior irányban pedig gátolja).

Egy harmadik fajta szabályozó elem is megtalálható a BX-C cisz-regulátor régióiban, ez pedig a sejt- vagy szövetspecifikus enhanszer (20. ábra). Transzgenikus kísérletekben ezek az

elemek sejt/szövetspecifikus kifejeződést tesznek lehetővé a riportergén számára az embrió AP tengelye mentén. Eredeti környezetükben, a BX-C-en belül ezen elemek működése is szelvényt specifikus módon korlátozott, amely könnyen magyarázható, ha ezek az enhanszerek is az iniciátor elemek és a PRE/TRE-k szabályozása alatt állnak.

Nagyszámú, a BX-C-ben enhanszercsapdát hordozó vonalat hoztak létre, melyek vizsgálatával meglepő észrevételek születtek (összefoglalva Maeda és Karch, 2006). Az egymástól tekintélyes távolságra elhelyezkedő enhanszercsapda-transzpozonok gyakran ugyanazt a kifejeződési mintázatot mutatták, míg mások – amelyek csak néhány kilobázisnyira voltak egymástól – eltérő mintázatot eredményeztek. A *lacZ* riportergén kifejeződésének minden esetben megfigyelhető volt továbbá egy anterior határa, amely egy-egy paraszelvénynek felelt meg. Ezekből a megfigyelésekből arra következtettek, hogy a BX-C enhanszerei kromoszomális doménekben helyezkednek el, az egy doménben elhelyezkedő szabályozóelemek pedig egymással összhangban, egyformán szabályozódnak. Így az enhanszercsapda-transzpozonok egyszerűen a domén állapotának érzékelőiként működnek, a domének kiterjedése pedig térképezhető az egyes enhanszercsapda-vonalak összehasonlításával. A doménelméletből következik a határolóelemek (20. ábra) létezése, amelyek az egyes doméneket választják el egymástól. Az 17. ábrán (77. oldal) éles színátmenetek jelzik a határolóelemek helyét. Eddig 3 határolóelemet sikerült azonosítani mutációs analízissel (*Mcp*, *Fab-7*, *Fab-8*). Ezek közül a *Fab-7* a legjobban jellemzett (Mihaly és mtsai., 1997), amely az *iab-6* cisz-regulátor régiót választja el az *iab-7*-től. Ha a *Fab-7* határolóelemet eltávolítjuk (II. típusú *Fab-7* deléciók), a két domén egy új működési egységgé fúzionál. Ennek a fúciónak az lesz a következménye, hogy bizonyos A6 sejtekben az *iab-7* régió inaktiválja az *iab-6* enhanszereit, más A6 sejtekben pedig az *iab-6* ektopikusan aktiválja az *iab-7* enhanszereit a normálisnál egy paraszelvénnel előrébb. A fenotípus szintjén ez úgy jelentkezik, hogy az A6 szelvény A5- ill. A7-szerű klónok mozaikjából épül fel. A határolóelemeket transzgenikus kísérletekben azon tulajdonságuk alapján tesztelik, hogy képesek az enhanszer és a riportergén promótere közötti kapcsolat létrejöttét meggátolni abban az esetben, ha az enhanszer és a promóter közé helyezik őket.

A BX-C működésére felállított modell szerint minden regulátor régió egy speciális szabályozóelem-modulokból felépülő kromoszomális domén, melyben az elemek ahhoz szükségesek, hogy egy adott *Hox* gén kifejeződjön egy bizonyos paraszelvénytől poszterior irányban elhelyezkedő minden szelvényben (18. ábra, 78. oldal és 20. ábra). Minden doménben

elsődleges fontossággal bír az iniciátor elem, amely képes leolvasni a gap és pair-rule géntermékek által „szállított” pozicionális információt, majd továbbküldeni a domén aktiválására vagy represszállására vonatkozó jelet. A PRE/TRE – az iniciátor elem állapotára válaszolva – a domén kromatinszerkezetének megváltoztatásával stabilizálja ezt a döntést. Ezeket a módosításokat a PcG és TrxG fehérjék hajtják végre. Ha a domén aktív, a benne található különböző enhanszerek a hozzájuk tartozó gén promóterét vezérlik az adott paraszelvevényben és attól hátrafelé. Ha a domén represszállt állapotban van, egyetlen enhanszerének sincs hozzáférése a promóterhez. A doméneket elválasztó határolóelemek biztosítják a domének autonóm működését.

A BX-C 90 éve tartó kutatása számos izgalmas felfedezéssel szolgált a tudományos világ számára. A térképpozíció és a szelveényspecifikus működés konzervált összefüggésétől (kolinearitás) az evolúció egyik mechanizmusának, a génkettőződésnek a felfedezéséig a BX-C kutatása mindig új tudományterületek születését jelentette. Az elkövetkezendő években a BX-C valószínűleg új megvilágításba fogja helyezni jelenlegi gondolkodásunkat a génekről és arról, hogy a kiterjedt intergénikus szakaszok milyen módon járulnak hozzá a génszabályozás igen bonyolult rendszeréhez.

IRODALOMJEGYZÉK

Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. és Koseki, H. (2001) Mice doubly deficient for the Polycomb Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. *Development* **128**, 1587-97.

Altschul, SF., Madden, TL., Schäffer, AA., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. és Lipman, DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.

Americo, J., Whiteley, M., Brown, JL., Fujioka, M., Jaynes, JB. és Kassis, JA. (2002) A complex array of DNA-binding proteins required for pairing-sensitive silencing by a polycomb group response element from the *Drosophila engrailed* gene. *Genetics* **160**, 1561-71.

Atchison, L., Ghias, A., Wilkinson, F., Bonini, N. és Atchison, ML. (2003) Transcription factor YY1 functions as a PcG protein in vivo. *EMBO J* **22**, 1347-58.

Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, HF., John, RM., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merckenschlager, M. és Fisher, AG. (2006) Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* **8**, 532-8.

Becker, PB. (1995) *Drosophila* chromatin and transcription. *Semin Cell Biol* **6**, 185-90.

Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. és Sauer, F. (2002) Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* **419**, 857-62.

Bejarano, F. és Busturia, A. (2004) Function of the Trithorax-like gene during *Drosophila* development. *Dev Biol* **268**, 327-41.

Bender, W., Spierer, P. és Hogness, DS. (1983) Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* **168**, 17-33.

Bender, W. és Hudson, A. (2000) P element homing to the *Drosophila* bithorax complex. *Development* **127**, 3981-92.

Bender, W. és Fitzgerald, DP. (2002) Transcription activates repressed domains in the *Drosophila* bithorax complex. *Development* **129**, 4923-30.

Bernstein, BE., Mikkelsen, TS., Xie, X., Kamal, M., Huebert, DJ., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R. és mtsai. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-26.

Beuchle, D., Struhl, G. és Müller, J. (2001) Polycomb group proteins and heritable silencing of Drosophila Hox genes. *Development* **128**, 993-1004.

Bevilacqua, A., Fiorenza, MT. és Mangia, F. (2000) A developmentally regulated GAGA box-binding factor and Sp1 are required for transcription of the hsp70.1 gene at the onset of mouse zygotic genome activation. *Development* **127**, 1541-51.

Blastyák, A., Mishra, RK., Karch, F. és Gyurkovics, H. (2006) Efficient and specific targeting of Polycomb group proteins requires cooperative interaction between Grainyhead and Pleiohomeotic. *Mol Cell Biol* **26**, 1434-44.

Bloyer, S., Cavalli, G., Brock, HW. és Dura, J. (2003) Identification and characterization of polyhomeotic PREs and TREs. *Dev Biol* **261**, 426-42.

Boivin, A., Gally, C., Netter, S., Anxolabéhère, D. és Ronsseray, S. (2003) Telomeric associated sequences of Drosophila recruit polycomb-group proteins in vivo and can induce pairing-sensitive repression. *Genetics* **164**, 195-208.

Boyer, LA., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, LA., Lee, TI., Levine, SS., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, MK., Bell, GW. és mtsai. (2006) Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**, 349-53.

Bracken, AP., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, KH. és Helin, K. (2006) Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* **20**, 1123-36.

Bray, SJ. és Kafatos, FC. (1991) Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in Drosophila. *Genes Dev* **5**, 1672-83.

Breiling, A., Turner, BM., Bianchi, ME. és Orlando, V. (2001) General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. *Nature* **412**, 651-5.

Brown, JL., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, ML. és Kassis, JA. (1998) The Drosophila Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol Cell* **1**, 1057-64.

Brown, JL., Fritsch, C., Mueller, J. és Kassis, JA. (2003) The Drosophila pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. *Development* **130**, 285-94.

Brown, JL., Grau, DJ., DeVido, SK. és Kassis, JA. (2005) An Sp1/KLF binding site is important for the activity of a Polycomb group response element from the Drosophila engrailed gene. *Nucleic Acids Res* **33**, 5181-9.

Buchenau, P., Hodgson, J., Strutt, H. és Arndt-Jovin, DJ. (1998) The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in *Drosophila* embryos: impact on models for silencing. *J Cell Biol* **141**, 469-81.

Busturia, A., Wightman, CD. és Sakonju, S. (1997) A silencer is required for maintenance of transcriptional repression throughout *Drosophila* development. *Development* **124**, 4343-50.

Busturia, A., Lloyd, A., Bejarano, F., Zavortink, M., Xin, H. és Sakonju, S. (2001) The MCP silencer of the *Drosophila* Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression. *Development* **128**, 2163-73.

Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, RS. és Zhang, Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039-43.

Cavalli, G. és Paro, R. (1998) The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell* **93**, 505-18.

Chan, CS., Rastelli, L. és Pirrotta, V. (1994) A Polycomb response element in the *Ubx* gene that determines an epigenetically inherited state of repression. *EMBO J* **13**, 2553-64.

Chang, Y., King, B., Lin, S., Kennison, JA. és Huang, D. (2007) A double-bromodomain protein, FSH-S, activates the homeotic gene *ultrabithorax* through a critical promoter-proximal region. *Mol Cell Biol* **27**, 5486-98.

Cheutin, T., Gorski, SA., May, KM., Singh, PB. és Misteli, T. (2004) In vivo dynamics of Swi6 in yeast: evidence for a stochastic model of heterochromatin. *Mol Cell Biol* **24**, 3157-67.

Chiang, A., O'Connor, MB., Paro, R., Simon, J. és Bender, W. (1995) Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. *Development* **121**, 1681-9.

Chinwalla, V., Jane, EP. és Harte, PJ. (1995) The *Drosophila* trithorax protein binds to specific chromosomal sites and is co-localized with Polycomb at many sites. *EMBO J* **14**, 2056-65.

Chuikov, S., Kurash, JK., Wilson, JR., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, GS., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gamblin, SJ., Barlev, NA. és mtsai. (2004) Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* **432**, 353-60.

Collins, RT. és Treisman, JE. (2000) Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of wingless target genes. *Genes Dev* **14**, 3140-52.

Corona, DF., Armstrong, JA. és Tamkun, JW. (2004) Genetic and cytological analysis of Drosophila chromatin-remodeling factors. *Methods Enzymol* **377**, 70-85.

Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. és Pirrotta, V. (2002) Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**, 185-96.

DeCamillis, M., Cheng, NS., Pierre, D. és Brock, HW. (1992) The polyhomeotic gene of Drosophila encodes a chromatin protein that shares polytene chromosome-binding sites with Polycomb. *Genes Dev* **6**, 223-32.

Decoville, M., Giacomello, E., Leng, M. és Locker, D. (2001) DSP1, an HMG-like protein, is involved in the regulation of homeotic genes. *Genetics* **157**, 237-44.

Dellino, GI., Tatout, C. és Pirrotta, V. (2002) Extensive conservation of sequences and chromatin structures in the bxd polycomb response element among Drosophilid species. *Int J Dev Biol* **46**, 133-41.

Dellino, GI., Schwartz, YB., Farkas, G., McCabe, D., Elgin, SCR. és Pirrotta, V. (2004) Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell* **13**, 887-93.

Dimri, GP., Martinez, J., Jacobs, JLL., Keblusek, P., Itahana, K., Van Lohuizen, M., Campisi, J., Wazer, DE. és Band, V. (2002) The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **62**, 4736-45.

Déjardin, J. és Cavalli, G. (2004) Chromatin inheritance upon Zeste-mediated Brahma recruitment at a minimal cellular memory module. *EMBO J* **23**, 857-68.

Déjardin, J., Rappailles, A., Cuvier, O., Grimaud, C., Decoville, M., Locker, D. és Cavalli, G. (2005) Recruitment of Drosophila Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature* **434**, 533-8.

Fauvarque, MO. és Dura, JM. (1993) polyhomeotic regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in Drosophila. *Genes Dev* **7**, 1508-20.

Fauvarque, MO., Zuber, V. és Dura, JM. (1995) Regulation of polyhomeotic transcription may involve local changes in chromatin activity in Drosophila. *Mech Dev* **52**, 343-55.

Ficz, G., Heintzmann, R. és Arndt-Jovin, DJ. (2005) Polycomb group protein complexes exchange rapidly in living Drosophila. *Development* **132**, 3963-76.

Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, SA., Kim, Y., Allis, CD. és Khorasanizadeh, S. (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**, 1870-81.

Fischle, W., Wang, Y. és Allis, CD. (2003) Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* **425**, 475-9.

Francis, NJ., Saurin, AJ., Shao, Z. és Kingston, RE. (2001) Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol Cell* **8**, 545-56.

Fritsch, C., Brown, JL., Kassis, JA. és Müller, J. (1999) The DNA-binding polycomb group protein pleiohomeotic mediates silencing of a *Drosophila* homeotic gene. *Development* **126**, 3905-13.

Furuyama, T., Tie, F. és Harte, PJ. (2003) Polycomb group proteins ESC and E(Z) are present in multiple distinct complexes that undergo dynamic changes during development. *Genesis* **35**, 114-24.

Gindhart, JGJ. és Kaufman, TC. (1995) Identification of Polycomb and trithorax group responsive elements in the regulatory region of the *Drosophila* homeotic gene *Sex combs reduced*. *Genetics* **139**, 797-814.

Goldberg, ML., Colvin, RA. és Mellin, AF. (1989) The *Drosophila* *zeste* locus is nonessential. *Genetics* **123**, 145-55.

Hadorn, E. (1978). Imaginal discs: transdetermination. In *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 2c (eds M. Ashburner and T. R. F. Wright), 555-617. New York: Academic Press.

Hagstrom, K., Muller, M. és Schedl, P. (1997) A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the *Fab-7* boundary in the *Drosophila* bithorax complex. *Genetics* **146**, 1365-80.

Hanson, RD., Hess, JL., Yu, BD., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van der Lugt, NM., Shashikant, CS., Ruddle, FH., Seto, M. és Korsmeyer, SJ. (1999) Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14372-7.

Hodgson, JW., Argiropoulos, B. és Brock, HW. (2001) Site-specific recognition of a 70-base-pair element containing d(GA)(n) repeats mediates bithoraxoid polycomb group response element-dependent silencing. *Mol Cell Biol* **21**, 4528-43.

Hogga, I. és Karch, F. (2002) Transcription through the *iab-7* cis-regulatory domain of the bithorax complex interferes with maintenance of Polycomb-mediated silencing. *Development* **129**, 4915-22.

Horard, B., Tatout, C., Poux, S. és Pirrotta, V. (2000) Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* **20**, 3187-97.

Hsieh, T., Hakim, O., Ohad, N. és Fischer, RL. (2003) From flour to flower: how Polycomb group proteins influence multiple aspects of plant development. *Trends Plant Sci* **8**, 439-45.

Huang, D., Chang, Y., Yang, C., Pan, I. és King, B. (2002) pipsqueak encodes a factor essential for sequence-specific targeting of a polycomb group protein complex. *Mol Cell Biol* **22**, 6261-71.

Huang, D. és Chang, Y. (2004) Isolation and characterization of CHRASCH, a polycomb-containing silencing complex. *Methods Enzymol* **377**, 267-82.

Hur, M., Laney, JD., Jeon, S., Ali, J. és Biggin, MD. (2002) Zeste maintains repression of Ubx transgenes: support for a new model of Polycomb repression. *Development* **129**, 1339-43.

Hyde-DeRuyscher, RP., Jennings, E. és Shenk, T. (1995) DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1. *Nucleic Acids Res* **23**, 4457-65.

Jacobs, J.J.L. és van Lohuizen, M. (2002) Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1602**, 151-61.

Janody, F., Lee, JD., Jahren, N., Hazelett, D.J., Benlali, A., Miura, G.I., Draskovic, I. és Treisman, JE. (2004) A mosaic genetic screen reveals distinct roles for trithorax and polycomb group genes in Drosophila eye development. *Genetics* **166**, 187-200.

Kagey, MH., Melhuish, TA. és Wotton, D. (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* **113**, 127-37.

Kahn, TG., Schwartz, YB., Dellino, G.I. és Pirrotta, V. (2006) Polycomb complexes and the propagation of the methylation mark at the Drosophila ubx gene. *J Biol Chem* **281**, 29064-75.

Kal, A.J., Mahmoudi, T., Zak, NB. és Verrijzer, CP. (2000) The Drosophila brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev* **14**, 1058-71.

Karch, F., Weiffenbach, B., Peifer, M., Bender, W., Duncan, I., Celniker, S., Crosby, M. és Lewis, EB. (1985) The abdominal region of the bithorax complex. *Cell* **43**, 81-96.

Karch, F., Galloni, M., Sipos, L., Gausz, J., Gyurkovics, H. és Schedl, P. (1994) Mcp and Fab-7: molecular analysis of putative boundaries of cis-regulatory domains in the bithorax complex of Drosophila melanogaster. *Nucleic Acids Res* **22**, 3138-46.

Kassis, JA. (1994) Unusual properties of regulatory DNA from the Drosophila engrailed gene: three "pairing-sensitive" sites within a 1.6-kb region. *Genetics* **136**, 1025-38.

Katsani, KR., Hajibagheri, MA. és Verrijzer, CP. (1999) Co-operative DNA binding by GAGA transcription factor requires the conserved BTB/POZ domain and reorganizes promoter topology. *EMBO J* **18**, 698-708.

Kennison, JA. (2004) Introduction to Trx-G and Pc-G genes. *Methods Enzymol* **377**, 61-70.

Klymenko, T. és Müller, J. (2004) The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *EMBO Rep* **5**, 373-7.

Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Köcher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M. és Müller, J. (2006) A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev* **20**, 1110-22.

Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. és Reinberg, D. (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* **16**, 2893-905.

Lachner, M., O'Sullivan, RJ. és Jenuwein, T. (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* **116**, 2117-24.

Laney, JD. és Biggin, MD. (1997) Zeste-mediated activation by an enhancer is independent of cooperative DNA binding in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3602-4.

Lavigne, M., Francis, NJ., King, IFG. és Kingston, RE. (2004) Propagation of silencing; recruitment and repression of naive chromatin in trans by polycomb repressed chromatin. *Mol Cell* **13**, 415-25.

Lee, H. és Adler, PN. (2004) The grainy head transcription factor is essential for the function of the frizzled pathway in the Drosophila wing. *Mech Dev* **121**, 37-49.

Lee, TI., Jenner, RG., Boyer, LA., Guenther, MG., Levine, SS., Kumar, RM., Chevalier, B., Johnstone, SE., Cole, MF., Isono, K., Koseki, H. és mtsai. (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**, 301-13.

Lewis, EB. (1978) A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* **276**, 565-70.

Lewis, EB., Knafels, JD., Mathog, DR. és Celniker, SE. (1995) Sequence analysis of the cis-regulatory regions of the bithorax complex of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8403-7.

Lewis, EB. (1998) The bithorax complex: the first fifty years. *Int J Dev Biol* **42**, 403-15.

Lu, Q., Wallrath, LL., Granok, H. és Elgin, SC. (1993) (CT)_n (GA)_n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila hsp26* gene. *Mol Cell Biol* **13**, 2802-14.

Maeda, RK. és Karch, F. (2006) The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development* **133**, 1413-22.

Mahmoudi, T., Zuijderduijn, LMP., Mohd-Sarip, A. és Verrijzer, CP. (2003) GAGA facilitates binding of Pleiohomeotic to a chromatinized Polycomb response element. *Nucleic Acids Res* **31**, 4147-56.

Martin, CH., Mayeda, CA., Davis, CA., Ericsson, CL., Knafels, JD., Mathog, DR., Celniker, SE., Lewis, EB. és Palazzolo, MJ. (1995) Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8398-402.

Maurange, C. és Paro, R. (2002) A cellular memory module conveys epigenetic inheritance of hedgehog expression during *Drosophila* wing imaginal disc development. *Genes Dev* **16**, 2672-83.

McGinnis, W. és Krumlauf, R. (1992) Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**, 283-302.

Mihaly, J., Hogga, I., Gausz, J., Gyurkovics, H. és Karch, F. (1997) In situ dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb-response element. *Development* **124**, 1809-20.

Mihaly, J., Mishra, RK. és Karch, F. (1998) A conserved sequence motif in Polycomb-response elements. *Mol Cell* **1**, 1065-6.

Mihaly, J., Barges, S., Sipos, L., Maeda, R., Cléard, F., Hogga, I., Bender, W., Gyurkovics, H. és Karch, F. (2006) Dissecting the regulatory landscape of the Abd-B gene of the bithorax complex. *Development* **133**, 2983-93.

Mishra, RK., Mihaly, J., Barges, S., Spierer, A., Karch, F., Hagstrom, K., Schweinsberg, SE. és Schedl, P. (2001) The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol* **21**, 1311-8.

Miyagishima, H., Isono, K., Fujimura, Y., Iyo, M., Takihara, Y., Masumoto, H., Vidal, M. és Koseki, H. (2003) Dissociation of mammalian Polycomb-group proteins, Ring1B and Rae28/Ph1, from the chromatin correlates with configuration changes of the chromatin in mitotic and meiotic prophase. *Histochem Cell Biol* **120**, 111-9.

Mohd-Sarip, A., Venturini, F., Chalkley, GE. és Verrijzer, CP. (2002) Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **22**, 7473-83.

- Mohd-Sarip, A., Cléard, F., Mishra, RK., Karch, F. és Verrijzer, CP.** (2005) Synergistic recognition of an epigenetic DNA element by Pleiohomeotic and a Polycomb core complex. *Genes Dev* **19**, 1755-60.
- Mohrmann, L., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Kal, AJ., Heck, AJR. és Verrijzer, CP.** (2004) Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related Drosophila chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* **24**, 3077-88.
- Mulholland, NM., King, IFG. és Kingston, RE.** (2003) Regulation of Polycomb group complexes by the sequence-specific DNA binding proteins Zeste and GAGA. *Genes Dev* **17**, 2741-6.
- Muller, M., Hagstrom, K., Gyurkovics, H., Pirrotta, V. és Schedl, P.** (1999) The mcp element from the Drosophila melanogaster bithorax complex mediates long-distance regulatory interactions. *Genetics* **153**, 1333-56.
- Muyrers-Chen, I., Rozovskaia, T., Lee, N., Kersey, JH., Nakamura, T., Canaani, E. és Paro, R.** (2004) Expression of leukemic MLL fusion proteins in Drosophila affects cell cycle control and chromosome morphology. *Oncogene* **23**, 8639-48.
- Müller, J., Gaunt, S. és Lawrence, PA.** (1995) Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* **121**, 2847-52.
- Müller, J., Hart, CM., Francis, NJ., Vargas, ML., Sengupta, A., Wild, B., Miller, EL., O'Connor, MB., Kingston, RE. és Simon, JA.** (2002) Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**, 197-208.
- Müller, J. és Kassis, JA.** (2006) Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in Drosophila. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 476-84.
- Narbonne, K., Besse, F., Brissard-Zahraoui, J., Pret, A. és Busson, D.** (2004) polyhomeotic is required for somatic cell proliferation and differentiation during ovarian follicle formation in Drosophila. *Development* **131**, 1389-400.
- Nègre, N., Hennetin, J., Sun, LV., Lavrov, S., Bellis, M., White, KP. és Cavalli, G.** (2006) Chromosomal distribution of PcG proteins during Drosophila development. *PLoS Biol* **4**, e170.
- O'Connell, S., Wang, L., Robert, S., Jones, CA., Saint, R. és Jones, RS.** (2001) Polycomblite PHD fingers mediate conserved interaction with enhancer of zeste protein. *J Biol Chem* **276**, 43065-73.
- Orlando, V. és Paro, R.** (1995) Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 174-9.

Orlando, V., Jane, EP., Chinwalla, V., Harte, PJ. és Paro, R. (1998) Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early Drosophila embryogenesis. *EMBO J* **17**, 5141-50.

Otte, AP. és Kwaks, THJ. (2003) Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr Opin Genet Dev* **13**, 448-54.

Papoulas, O., Beek, SJ., Moseley, SL., McCallum, CM., Sarte, M., Shearn, A. és Tamkun, JW. (1998) The Drosophila trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* **125**, 3955-66.

Papp, B. és Müller, J. (2006) Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. *Genes Dev* **20**, 2041-54.

Peterson, AJ., Mallin, DR., Francis, NJ., Ketel, CS., Stamm, J., Voeller, RK., Kingston, RE. és Simon, JA. (2004) Requirement for sex comb on midleg protein interactions in Drosophila polycomb group repression. *Genetics* **167**, 1225-39.

Pires-daSilva, A. és Sommer, RJ. (2003) Finally, worm polycomb-like genes meet Hox regulation. *Dev Cell* **4**, 770-2.

Pirrotta, V., Chan, CS., McCabe, D. és Qian, S. (1995) Distinct parasegmental and imaginal enhancers and the establishment of the expression pattern of the Ubx gene. *Genetics* **141**, 1439-50.

Pirrotta, V. (1997) Chromatin-silencing mechanisms in Drosophila maintain patterns of gene expression. *Trends Genet* **13**, 314-8.

Platero, JS., Hartnett, T. és Eissenberg, JC. (1995) Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J* **14**, 3977-86.

Platero, JS., Sharp, EJ., Adler, PN. és Eissenberg, JC. (1996) In vivo assay for protein-protein interactions using Drosophila chromosomes. *Chromosoma* **104**, 393-404.

Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, SK., Cao, R., Worringer, KA., Wang, H., de la Cruz, CC., Otte, AP., Panning, B. és Zhang, Y. (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* **300**, 131-5.

Poux, S., Melfi, R. és Pirrotta, V. (2001) Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. *Genes Dev* **15**, 2509-14.

Poux, S., Horard, B., Sigrist, CJA. és Pirrotta, V. (2002) The Drosophila trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing. *Development* **129**, 2483-93.

Rank, G., Prestel, M. és Paro, R. (2002) Transcription through intergenic chromosomal memory elements of the *Drosophila* bithorax complex correlates with an epigenetic switch. *Mol Cell Biol* **22**, 8026-34.

Rastelli, L., Chan, CS. és Pirrotta, V. (1993) Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in *Drosophila* and their dependence on Enhancer of zeste function. *EMBO J* **12**, 1513-22.

Ringrose, L. és Paro, R. (2001) Remembering silence. *Bioessays* **23**, 566-70.

Ringrose, L., Rehmsmeier, M., Dura, J. és Paro, R. (2003) Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell* **5**, 759-71.

Ringrose, L. és Paro, R. (2004) Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* **38**, 413-43.

Ringrose, L. és Paro, R. (2007) Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* **134**, 223-32.

Rozovskaia, T., Tillib, S., Smith, S., Sedkov, Y., Rozenblatt-Rosen, O., Petruk, S., Yano, T., Nakamura, T., Ben-Simchon, L., Gildea, J., Croce, CM. és mtsai. (1999) Trithorax and ASH1 interact directly and associate with the trithorax group-responsive bxd region of the Ultrabithorax promoter. *Mol Cell Biol* **19**, 6441-7.

Sanchez-Elsner, T., Gou, D., Kremmer, E. és Sauer, F. (2006) Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit *Drosophila* Ash1 to Ultrabithorax. *Science* **311**, 1118-23.

Saurin, AJ., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. és Kingston, RE. (2001) A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* **412**, 655-60.

Schmitt, S., Prestel, M. és Paro, R. (2005) Intergenic transcription through a polycomb group response element counteracts silencing. *Genes Dev* **19**, 697-708.

Schwartz, YB., Kahn, TG., Nix, DA., Li, X., Bourgon, R., Biggin, M. és Pirrotta, V. (2006) Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* **38**, 700-5.

Schwartz, YB. és Pirrotta, V. (2007) Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* **8**, 9-22.

Sengupta, AK., Kuhrs, A. és Müller, J. (2004) General transcriptional silencing by a Polycomb response element in *Drosophila*. *Development* **131**, 1959-65.

Sewalt, RG., Kwaks, TH., Hamer, K. és Otte, AP. (2004) Biochemical analysis of mammalian polycomb group protein complexes and the identification of genetic elements that block polycomb-mediated gene repression. *Methods Enzymol* **377**, 282-96.

Simon, J., Chiang, A., Bender, W., Shimell, MJ. és O'Connor, M. (1993) Elements of the *Drosophila* bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products. *Dev Biol* **158**, 131-44.

Simon, J. (1995) Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during *Drosophila* development. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 376-85.

Simon, JA. és Tamkun, JW. (2002) Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 210-8.

Sipos, L., Mihály, J., Karch, F., Schedl, P., Gausz, J. és Gyurkovics, H. (1998) Transvection in the *Drosophila* Abd-B domain: extensive upstream sequences are involved in anchoring distant cis-regulatory regions to the promoter. *Genetics* **149**, 1031-50.

Smith, ST., Petruk, S., Sedkov, Y., Cho, E., Tillib, S., Canaani, E. és Mazo, A. (2004) Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nat Cell Biol* **6**, 162-7.

Strutt, H., Cavalli, G. és Paro, R. (1997) Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *EMBO J* **16**, 3621-32.

Strutt, H. és Paro, R. (1997) The polycomb group protein complex of *Drosophila melanogaster* has different compositions at different target genes. *Mol Cell Biol* **17**, 6773-83.

Su, I., Dobenecker, M., Dickinson, E., Oser, M., Basavaraj, A., Marqueron, R., Viale, A., Reinberg, D., Wülfing, C. és Tarakhovsky, A. (2005) Polycomb group protein *ezh2* controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* **121**, 425-36.

Sánchez-Herrero, E., Vernós, I., Marco, R. és Morata, G. (1985) Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature* **313**, 108-13.

Thomas, JO. és Travers, AA. (2001) HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **26**, 167-74.

Tie, F., Prasad-Sinha, J., Birve, A., Rasmuson-Lestander, A. és Harte, PJ. (2003) A 1-megadalton ESC/E(Z) complex from *Drosophila* that contains polycombl-like and RPD3. *Mol Cell Biol* **23**, 3352-62.

Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T. és Mazo, A. (1999) Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol Cell Biol* **19**, 5189-202.

Tiong, S., Bone, LM. és Whittle, JR. (1985) Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*. *Mol Gen Genet* **200**, 335-42.

Tolhuis, B., de Wit, E., Muijters, I., Teunissen, H., Talhout, W., van Steensel, B. és van Lohuizen, M. (2006) Genome-wide profiling of PRC1 and PRC2 Polycomb chromatin binding in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* **38**, 694-9.

Tripoulas, N., LaJeunesse, D., Gildea, J. és Shearn, A. (1996) The *Drosophila* ash1 gene product, which is localized at specific sites on polytene chromosomes, contains a SET domain and a PHD finger. *Genetics* **143**, 913-28.

Wang, L., Brown, JL., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, JA. és Jones, RS. (2004) Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* **14**, 637-46.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, RS. és Zhang, Y. (2004) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-8.

Wilkins, RC. és Lis, JT. (1998) GAGA factor binding to DNA via a single trinucleotide sequence element. *Nucleic Acids Res* **26**, 2672-8.

Yant, SR., Zhu, W., Millinoff, D., Slightom, JL., Goodman, M. és Gumucio, DL. (1995) High affinity YY1 binding motifs: identification of two core types (ACAT and CCAT) and distribution of potential binding sites within the human beta globin cluster. *Nucleic Acids Res* **23**, 4353-62.

Zink, B. és Paro, R. (1989) In vivo binding pattern of a trans-regulator of homoeotic genes in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **337**, 468-71.

Zink, B., Engström, Y., Gehring, WJ. és Paro, R. (1991) Direct interaction of the Polycomb protein with Antennapedia regulatory sequences in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* **10**, 153-62.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Megjelent publikációk

Kozma, G. (2005) *In situ* dissection of the bxd PRE in *Drosophila melanogaster*. *Acta Biol Szeged* **49**(3-4), 47

Sipos, L., Kozma, G., Molnár, E. és Bender, W. (2007) *In situ* dissection of a Polycomb response element in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12416-21.

Kozma, G., Bender, W. és Sipos, L. (2008) Replacement of a *Drosophila* Polycomb response element core, and *in situ* analysis of its DNA motifs. *Mol Genet Genomics* közlésre elfogadva

Konferencia-előadások és -poszterek

Kozma, G., Bender, W. , Sipos, L. (2005). A bxd PRE *in situ* vizsgálata *Drosophila melanogaster*-ben. **VI. Magyar Genetikai Kongresszus / XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok:** E79 (előadás)

Kozma, G., Sipos, L., Bender, W. (2005). *In situ* dissection of bxd PRE in *Drosophila melanogaster*. *European Drosophila Research Conference* **19**: CR15 (poszter).

Kozma, G., Bender, W. , Sipos, L. (2005). Gene conversion, site-directed mutagenesis: *In situ* dissection of a Polycomb Response Element (PRE) in *Drosophila melanogaster*. *Straub-napok* (előadás)

Kozma, G., Bender, W. , Sipos, L. (2006). *In situ* dissection of bxd PRE in *Drosophila melanogaster*. *Regional Drosophila Meeting* **12** (előadás)

Kozma, G., Bender, W. , Sipos, L. (2007). A bxd PRE *in situ* vizsgálata *Drosophila melanogaster*-ben. **VII. Magyar Genetikai Kongresszus / XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok:** P060 (poszter)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Sipos Lászlónak, aki helyet biztosított számomra a laboratóriumában és mindvégig különleges figyelmet fordított arra, hogy lelkiismeretesen támogassa munkámat. Türelme és hozzáértő oktató tevékenysége nagymértékben hozzásegített ahhoz, hogy elsajátíthassam a *bx_d* PRE *in situ* vizsgálatához szükséges elméleti és gyakorlati ismereteket, és hogy ez a dolgozat létrejöhessen. Köszönöm asszisztenseinknek, Ördög Edinának, Csendes Tiborné Aninak és Berente Anikónak a lelkiismeretes, kitartó és precíz munkájukat, amellyel jelentősen hozzájárultak kísérleteink sikeréhez. Köszönöm továbbá Velkeyné Krausz Ildikónak és Deákné Pál Margitnak az embriók injektálásában nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket. Hálával tartozom PhD-s társamnak, Molnár Enikőnek és Dr. Gyurkovics Henrik csoportjának a hasznos társalgásokért és vitákért, melyekben szinte mindig rendelkezésemre álltak. Molnár Enikőnek köszönöm a kísérletekben nyújtott segítségét is. Az együttműködő partnerünk, Dr. Welcome Bender által elkészített P-elem-gyűjtemény szintén előfeltétele volt e munka létrejöttének, valamint köszönet illeti a pályázati munkában történő közreműködéséért is. A Genetikai Intézet 6. emeletén dolgozó minden jelenlegi és volt munkatársam érdeme az a barátságos légkör, amely minden nehézséget könnyen leküzdhetővé tett.

Hálával tartozom édesanyámnak, aki mindvégig támogatta „őrült” ötletemet, mely szerint biológus akartam lenni. Köszönöm barátomnak és üzlettársamnak, Molnár Józsefnek a gondoskodását és hogy a nehéz időkben is mindig mellettem állt. Mély tisztelet és köszönet illeti a Flavon Group Kft.-t, aki lehetővé tette, hogy egészségesen, maximális energiával és „tisztá fejjel” tudjam a tudományos kutatómunka minden fázisát elvégezni. Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom a Kőrösi Csoma Jógaegyesületnek, amely biztosította számomra azokat a tanításokat, amelyek segítségével egyre növekvő bölcsességgel tudom a világ dolgait szemlélni és megtapasztalni.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az egyedfejlődés központi folyamata a szervezetet alkotó osztódó sejtek differenciációja. A sejtek differenciálódását leginkább azzal tudják jellemezni, hogy meghatározzák, a mintázatképződési folyamatok során génkészletükből pontosan mely géneket fejezik ki. A specifikus génkifejeződési konfigurációk átadását az utódsejteknek a belső “sejtmemória” biztosítja, ezáltal lehetővé válik az embriogenezis kezdetén meghatározott fejlődési programok megőrzése az egyedfejlődés végéig. A *Drosophila melanogaster* kiváló modellszervezet a “sejtmemória” molekuláris mechanizmusainak tanulmányozására, hiszen számos olyan génjét ismerjük, amely adott fejlődési állapotok meghatározásáért felelős. Ilyenek például a konzervált homeotikus gének, valamint az azok kromatin-szerkezetét szabályozó Polycomb (*PcG*) és trithorax csoportba (*trxG*) tartozó gének. Ha ezekben a génekben mutáció következik be, bizonyos testszelvények helyett másfajta szelvények alakulnak ki az élőlényekben. A *PcG* fehérjék negatív szabályozók: az ún. Polycomb Response Element-ekhez (PRE-k) kötődve tartják célgénjeiket transzkripcionálisan inaktív állapotban. A *TrxG* fehérjék pozitív szabályozók: az ún. Trithorax Response Element-eken (TRE-k) keresztül hatnak, feladatuk a célgén aktív állapotban tartása. Mindkét fehérjecsoport hatalmas fehérjekomplexekké áll össze, amelyek különböző biokémiai módosító képességeik segítségével változásokat idéznek elő a kromatin magasabbrendű szerkezetében, és ezáltal a gének szabályozásában.

Kísérleteinkben a *Drosophila melanogaster* homeotikus bithorax komplexén belül legtöbbet tanulmányozott, az ún. *bithoraxoid* Polycomb Response Element (*bxd* PRE) vizsgálatával foglalkoztunk. Ismert, hogy a PRE-k nagy távolságokból is képesek egymással kölcsönhatni, ennek ellenére korábban minden esetben transzgenikus konstrukciókba építve, különböző riportergének segítségével tanulmányozták ezt a régiót, *in situ* vizsgálatokat nem végeztek. Noha tesztrendszerrel függően a PRE-k gyakran más méretűnek adódtak, sőt az eredmények időnként egymásnak is ellentmondtak. Mivel a PRE-k egymással együttműködve fejtik ki hatásukat és különböző kromoszomális környezetekben eltérően viselkednek, elhatároztuk, hogy az eredeti helyén, *in situ* deléciók segítségével tanulmányozzuk a *bxd* PRE/TRE 3 kb nagyságú régióját. Célunk az volt, hogy megértsük a PRE-k működési mechanizmusát eredeti pozíciójukban, és kötőhelyek szintjén meghatározzuk a szekvencia-követelményeiket.

A *bxd* PRE *in situ* deléciós tanulmányozásához először kifejlesztettünk egy új *Drosophila*-ban használatos génkonverziós módszert. Kétféle konstrukciót készítettünk, amelyek templátul szolgáltak a génkonverzióhoz. Az egyik típusú konstrukció segítségével FRT (Flip recognition target) szekvenciák közé helyeztünk az általunk kiválasztott, eltávolítandó kis genomi DNS-szakaszt, amelyet a konverziót követően Flip/FRT-rekombináció indukálásával kivágtunk a kromoszómából. A másik típusú konstrukció segítségével *I-SceI*-hasítóhelyet építettünk a *bxd* PRE egy tetszőleges pozíciójába. Ebben az esetben a hasítóhelytől kiindulva, random méretű deléciókat hoztunk létre a konverziós kromoszóma *I-SceI* enzimmel történő hasításával. Mindkét esetben – a korábban alkalmazott génkonverziós módszerhez képest – megnöveltük a technika hatékonyságát azzal, hogy markergént építettünk a konstrukciókba, amellyel követni tudtunk mind a konverzió, mind a deléció létrejöttét. A deléciós kromoszómában maradó FRT-helyeket felhasználtuk az egyes deléciók összekapcsolására és duplikációk létrehozására.

Korábban három, potenciális PRE-aktivitással rendelkező szakaszt azonosítottak immunoprecipitáció segítségével a *bxd* PRE/TRE 3 kb-os régiójában. Eredményeink alapján azonban csak a középső eltávolítása ($\Delta 1-2$, 665 bp) csökkenti le a *bxd* PRE működését észrevehető módon. Azok a legyek, amelyek heterozigóta formában hordozták ezt a deléciót, ~64 % -os gyakorisággal poszterior irányú transzformációkat mutattak. Jellemzően a szárny billérré és/vagy a 3. torszelvény 1. potrohszelvénné történő részleges transzformációját figyeltük meg rajtuk. A mutáns fenotípusok azt jelzik, hogy ezekben a legyekben az 5. paraszelvény (PS5) 6. paraszelvénné (PS6) transzformálódott. A fenti eredményeknek megfelelően nem tapasztaltunk növekedést a fenotípus penetranciájában akkor sem, amikor a deléció méretét kiterjesztettük a teljes 3 kb-os régióra ($\Delta 7-13$).

A korábbi transzgenikus kísérletek eredményei alapján a 3 kb-t kiejtő $\Delta 7-13$ deléció nemcsak a PRE-kat, hanem minden ismert TRE-t is eltávolítja a *bxd* szabályozó-régióból. Noha a TRE-k eltávolításától a szabályozott gén (*Ubx*) kifejeződésének csökkenését várnánk, a $\Delta 7-13$ homozigótákban mégsem tapasztaltuk anterior irányú transzformációk megjelenését, amely ezt jelezte volna számunkra. Ahogyan azt más csoportok transzgenikus eredményei is sugallták, mi is arra következtettünk, hogy a TRE-k szerepe az, hogy ellensúlyozzák a PRE-k inaktíváló hatását azokban a szelvényekben, ahol az őket tartalmazó szabályozó-régióknak aktívnak kell lennie.

Megerősítjük tehát azokat a következtetéseket, melyek szerint a TRE-k – a korábbi, széleskörben elterjedt nézettel szemben – antirepresszorként, és nem koaktivátorként működnek.

Annak érdekében, hogy tovább szűkítsük a *bx*d PRE működéséhez szükséges szakasz méretét, létrehoztunk három olyan deléciót, amely a Δ 1-2 által lefedett DNS-fragmentum alrészeit távolítja el (Δ 10, 280 bp; Δ 17, 185 bp; Δ 12, 127 bp). A Δ 17 volt a legkisebb méretű, amely még mindig poszterior transzformációkat okozott a legyek 22 %-ában. Ha ennek a 185 bp-os szakasznak bármely részét épen hagytuk, nem tapasztaltunk transzformációkat még akkor sem, ha egyúttal a szomszédos szekvenciákat is kivágtuk. Ezért a 185 bp-os szakaszt elneveztük *bx*d PRE-magnak. Érdekes módon minden olyan törzsben, amelyben az egyik homológ kromoszómáról hiányzott a PRE-mag (heterozigóta), a fenotípus penetranciája az egymást követő generációkban fokozatosan csökkent. A homozigóta Δ 1-2 és Δ 10 legyekben a penetrancia közelített a 100 %-hoz, és nem változott a törzsek fenntartása során sem. A Δ 17 esetén azonban még a homozigóta törzsben is folyamatosan csökkent a penetrancia. A fenotípus expresszivitása csak a homozigóta Δ 1-2 esetén maradt állandó, a két kisebb delécióra homozigóta állatokban csökkent. Ezekből az adatokból arra következtettünk, hogy a *bx*d PRE moduláris szerkezetű. A PRE-mag szomszédságában elhelyezkedő szekvenciák részben helyettesíteni képesek a mag funkcióját. Sőt, maga a PRE-mag is redundáns modulokból épül fel, amelyek – valószínűleg a szomszédos szekvenciákkal együttműködve – teljes mértékben képesek kompenzálni a másik/többi modul kiesését a magból. Súlyosabb fenotípust tapasztaltunk a Δ 1-2 hemizigóta legyekben, mint a Δ 1-2 heterozigótákban, ami arra utal, hogy a *bx*d PRE más, a vad típusú homológ kromoszómán található szekvenciákkal (valószínűleg a *bx*d PRE-val) is együttműködik.

A *bx*d és *iab-7* PRE-k nagy hasonlóságot mutatnak a GAGA- és PHO-kötőhelyek mintázatában. Irodalmi adatok szerint ezen kötőhelyek fontos szereppel bírnak a PRE-k felépítésében, valamint több megtalálható belőlük az általunk definiált *bx*d PRE-magban is. A fentiekből kiindulva elhatároztuk, hogy a *bx*d PRE magját kicseréljük két másik PRE-magra (*iab-5* és *iab-7*), amelyek szintén a BX-C-ben találhatók. Mindkét szekvencia – orientációra való tekintet nélkül – teljes mértékben képes volt helyettesíteni a *bx*d PRE-mag funkcióját, ezenkívül nem okozott semmilyen „furcsa” fenotípust, ami azt bizonyítja, hogy a PRE-k nem hordoznak magukban pozicionális információt; hanem inkább egyszerű csendesítő-elemekként (silencer) működnek. Kerestünk homológiával és hasonló kötőhely-mintázattal rendelkező DNS-szakaszokat a humán genomban is, ahol eddig még nem azonosítottak PRE-kat. Egyetlen ilyen

szekvenciát találtunk (H1), majd megvizsgáltuk képes-e betölteni a *bx*d PRE-mag szerepét. A H1 nem viselkedett PRE-ként, azonban sikerült felállítottunk egy hatékony tesztrendszert, amellyel azonosíthatók (*Drosophila*) PRE-ként működő DNS-szekvenciák.

Három különböző, a *bx*d PRE-magban halmozottan előforduló kötőhely elrontásával megvizsgáltuk azt is, hogy az egyes kötőhelyek milyen mértékben járulnak hozzá a PRE-funkcióhoz. A GAGA- és a PHO-motívumok külön-külön történő mutáltatása viszonylag alacsony penetrancia-értékeket eredményezett, a két kötőhely együttes elrontása azonban a penetrancia tekintetében egyenértékű volt a mag teljes eltávolításával. Vagyis e két kötőhely esszenciális építőköve a *bx*d PRE-nak. Ezzel ellentétben a DSP fehérjével kapcsolatban – amelyről kimutatták, hogy szükséges az *Ubx* aktivációjához – *in situ* nem találtunk bizonyítékot arra, hogy szignifikáns szerepe lenne a *bx*d PRE működésében. Részben tudtuk tehát megerősíteni *in situ* az esszenciális PcG-kötőhelyekre vonatkozó korábbi, transzgenikus adatokat, kifejlesztettünk azonban egy olyan hatékony módszert, amely alkalmas lesz a PRE-k szekvencia-követelményeinek még pontosabb meghatározására.

A felnőtt legyeken tapasztalt fenotípusok kiértékelésén kívül a *bx*d régió által szabályozott *Ubx* gén kifejeződési mintázatát is vizsgáltuk embrionális és lárvális szövetek UBX-elenanyaggal történő festésével. Ezenkívül bizonyos konstrukciókba megfelelően beépített *Gal4-VP16* markergén segítségével – az UAS-eGFP-rendszeren keresztül – a *bx*d szabályozó-regió helyi kromatinszerkezetét is tanulmányozni tudtuk. A felnőtt állatok fenotípusainak megfelelően az *Ubx* gén a PS5-ben mutatott enyhébb ektopikus kifejeződést azokban a lárvákban, amelyekben legalább a magot eltávolítottuk a *bx*d PRE-ből. Az *Ubx*-szel ellentétben, az eGFP esetén nagymértékű ektopikus kifejeződést találtunk, a fehérje még a feji szelvényekben is jelen volt. A másik szembevetendő különbség a két gén kifejeződési szintjében mutatkozott: a deléciókra heterozigóta legyekben az eGFP intenzitása csökkent, míg az UBX szintje nőtt az egyszerű *Gal4-VP16*-inszerciókhoz képest. Nagyon valószínű, hogy a tapasztalt különbségek a két gén eltérő szabályozását tükrözik: a *Gal4-VP16* minden bizonnyal csupán egy szomszédos enhanszer által szabályozódik, míg az *Ubx* sokkal bonyolultabb reguláció alá esik, amely módosítja a *bx*d PRE-deléció hatásait. Modellünk szerint a *bx*d PRE fehérjéken keresztül kötődik az *Ubx* legalább egy enhanszeréhez és szabályozza annak aktivitását még azokban a szelvényekben is, ahol a *bx*d régió aktív. Tehát amellett, hogy eredményeink megerősítik a korábbi adatokat, melyek szerint a PRE-k fehérjéken keresztül a célgén promóteréhez

kapcsolódnak, rámutatnak bizonyos specifikus enhanszerek ezekben a finoman szabályozott, hatalmas kromatin-komplexekben betöltött jelentős szerepére is.

SUMMARY

The main process in development is the specialization of dividing cells that make up an organism. Specialization can be best characterized by the differential gene expression profiles established during patterning processes. Cells possess an inherent “cellular memory” which provides the transmission of specific gene expression configurations to daughter cells, enabling them to maintain developmental programs determined early in embryogenesis for the rest of development. *Drosophila melanogaster* is an ideal model organism to study the molecular mechanisms underlying “cellular memory”, since several of its genes affecting different developmental states have been characterized. Among these are the conserved homeotic genes and their chromatin regulators, the Polycomb (*PcG*) and trithorax Group (*trxG*) of genes. Mutations in these genes cause the transformation of a given segment into the identity of another one. PcG proteins are negative regulators: they bind to Polycomb Response Elements to maintain their target genes in a repressed transcription state. TrxG proteins are positive regulators: they act through Trithorax Response Elements to keep their target genes in an active state. Both groups of proteins form large multiprotein complexes, which use various biochemical activities to alter higher order chromatin structure and, thus, regulate transcription.

Our studies focus on the most extensively studied silencer region in the homeotic bithorax complex of *Drosophila melanogaster*, called *bithoraxoid* Polycomb Response Element (*bxo* PRE). Although PREs are known to interact with each other over long distances, all previous experiments used mobile element constructs with various reporter genes; no *in situ* dissection of this region has been performed. In different tests, PREs often proved to be of varying size; moreover, results were sometimes even contradictory. As PREs function cooperatively and behave differently in different chromosomal contexts, we decided to study the *bxo* PRE *in situ*. To analyze how PREs function in their natural chromosomal context, and, first, to determine their sequence requirements in terms of binding sites, we have generated *in situ* deletions within a 3-kb region of the *bxo* PRE/TRE, and examined their effect.

To carry out the deletional analysis of the *bxo* PRE, we have devised a novel strategy for gene conversion in *Drosophila*. We designed two different types of conversion constructs, which allowed us to generate small deletions of either pre-determined or random size. Templates for conversion included FRT-sites flanking small genomic sequences or restriction sites for the yeast

I-SceI enzyme, which permit generating small deficiencies by FLP/FRT recombination or by the *I-SceI* induced double strand DNA breaks, respectively. Compared to the previously existing gene conversion methods, the use of marker genes in our constructs enabled us to easily identify conversion events and deletion-carrying animals, thus, increasing efficiency. The FRT sites remaining in the deletion chromosomes could also be used to merge different deletions or create duplications.

Previously, 3 sub-elements with potential PRE-activities were identified by chromatin immuno-precipitation in the 3-kb region of the *bx*d PRE/TRE. However, we have found that only the removal of the central one (Δ 1-2, 665 bp) decreases *bx*d PRE function to a detectable degree. Flies carrying this deletion showed partial posteriorly directed transformations, such as wing into haltere and/or 3rd thoracic segment into 1st abdominal segment, with a penetrance of ~64 % when heterozygous. The observed mutant phenotypes correspond to the transformation of parasegment 5 (PS5) to parasegment 6 (PS6). Consistent with our findings, no increase in the penetrance was observed when we extended the size of the deleted sequence to the whole 3-kb region (Δ 7-13).

Relying on previous transgenic results, the 3-kb Δ 7-13 deletion removes not only PREs, but also all known TREs from the *bx*d region. Although from the loss of TREs one would expect a reduction in the expression of the target gene (*Ubx*), in Δ 7-13 homozygotes, we saw no anteriorly directed transformations, which would have indicated such a change. In agreement with the suggestions from transgenic data by other groups, we propose that TREs function to counteract PREs inactivating effect in those segments, where the regulatory region harbouring them is supposed to be active. Thus, we further confirm that TREs do not act as activators, as widely thought previously, but rather as antirepressors.

To further narrow down the size of the region essential for *bx*d PRE function, we generated three deletions internal to Δ 1-2 (Δ 10, 280 bp; Δ 17, 185 bp; Δ 12, 127 bp). Δ 17 was the smallest one which still caused posterior transformations in 22 % of the flies. If we left parts of this 185-bp fragment intact in the chromosome, we observed no transformations, even if we excised the neighbouring sequences in addition. Thus, we named the 185-bp sequence the *bx*d PRE core. Interestingly, in all stocks with the missing PRE core, the penetrance of the phenotype gradually decreased in subsequent generations when heterozygous. In homozygous Δ 1-2 and Δ 10 flies, the penetrance approached 100 % and was stable during stock maintenance. In the case

of $\Delta 17$, the penetrance decreased even in the homozygous stock. However, the expressivity of the phenotype was stable only in homozygous $\Delta 1-2$; it decreased in flies homozygous for the two smaller deletions. From these data, we concluded that the *bx*d PRE has a modular structure. The sequences flanking the PRE core can partially replace the function of the core. Even the PRE core itself consists of redundant modules, which, probably cooperating with the neighbouring sequences, can fully compensate for the loss of other module(s) from the core. The phenotype is more serious in hemizygous $\Delta 1-2$ than in heterozygous $\Delta 1-2$ flies, which shows that the *bx*d PRE also cooperates with other sequences (probably the *bx*d PRE) on the wild type homolog.

Considering that the *bx*d and *iab-7* PREs share a similar pattern of GAGA and PHO protein binding sites, reported to be important for PRE function, and many of which found in the *bx*d PRE core, we decided to replace the *bx*d PRE core with two “foreign” PRE cores from the *iab-5* and *iab-7* regions of the BX-C. Both sequences, in either orientation, could fully replace the function of the *bx*d PRE core, and, besides, did not cause any “loss-of-function” phenotypes, showing that PREs do not carry positional information; rather, they act as simple silencers. We also searched for DNA stretches with homology and similar binding site pattern in the human genome, in which no PREs have been identified to date. We found one such sequence (H1), and then tested if it could fulfil the function of the *bx*d PRE core. H1 did not behave as a PRE, however, our results show that we established an efficient test system to identify sequences with (*Drosophila*) PRE function.

To examine the degree of contribution of different protein binding sites to PRE function, we mutated the arrays of three types of binding sites within the *bx*d PRE core. Mutating either GAGA or PHO motifs resulted in relatively low penetrances, however, mutating GAGA and PHO motifs together was equivalent in terms of penetrance with the removal of the whole core. Thus, these two protein binding sites essential building stones of the *bx*d PRE. In contrast, DSP1 protein binding sites, reported to be required for the activation of *Ubx*, appeared to play little role, if any, *in situ* in the function of the *bx*d PRE. Thus, we could only partly confirm previous transgenic results about essential PcG binding sites *in situ*, and, more importantly, devised a powerful method to further define the sequence requirements of PREs.

Besides observing the phenotypes of adult flies, we have also examined the expression pattern of the *Ubx* gene controlled by the *bx*d region, using antibody staining against the UBX protein in embryonic and larval tissues. Also, the *Gal4-VP16* marker gene, cloned appropriately

in certain constructs, enabled us to study, through the UAS-eGFP system, the local chromatin structure of the *bx**d* regulatory region. In agreement with the adult phenotypes, the *Ubx* gene showed only a modest ectopic expression in PS5 when at least the core was removed from the *bx**d* PRE. In contrast to *Ubx*, eGFP showed extreme ectopic expression even in the head segments. Another striking difference was observed in the gene expression level of these two genes: in deletion-bearing heterozygotes, the intensity of eGFP decreased, while the level of *Ubx* increased, as compared to the simple *Gal4-VP16* insertion. Very likely, these differences reflect the differences between the regulation of the two genes: *Gal4-VP16* is most likely controlled by a single neighbouring enhancer, while *Ubx* falls under a much more complex regulation that modifies the effect of *bx**d* PRE deletion. Importantly, our data also imply that the *bx**d* PRE binds to at least one *Ubx* enhancer and regulates its activity even in those segments, where the *bx**d* region is active. Thus, besides confirming previous findings that PREs bind to the target gene promoter through proteins, we propose that in these finely tuned, large chromatin complexes, specific enhancers are also major components.